

重金屬污染土壤之微生物族群多樣性分析

洪俊雄*、許淑娟**、張飴璇***

摘要

目前國內於受污染農地之整治處理方面，多半優先考慮以物化方法來儘可能去除污染物，鮮少考慮此類處理過程可能對土壤微生物族群結構所造成的永久破壞，使得農地地力破壞至無法回復正常農業用途。惟有保持健康的微生物族群(功能以及菌種多樣)，才能在後續農地使用上發揮其正常的作用，因此，本研究嘗試結合微生物功能基因以及演化基因之特徵分析，期望能建立土壤微生物族群之功能及菌相組成多樣性，以提供未來農地土壤污染整治技術及策略之依據。

*國立中興大學環境工程系所	教授
**國立中興大學環境工程系所	博班生
***國立中興大學環境工程系所	研究生

一、前言

早期由人類活動產生的輕微污染，可藉由環境的自淨作用而減輕影響，但隨著工業發展，所產生的污染也複雜到超過環境自淨能力所能負荷的範圍，且由於當時未妥善規劃，常在田間見到工廠座落其中或工廠廢水直接排放至灌溉溝渠，導致於農田灌溉用水受到污染而污染農田及土壤的情形發生。近幾年來有關土壤生態系的研究逐漸被重視，除在污染防治、水土保持上的土壤學研究外，更重要的是發現土壤中的「生物多樣性」富含了生物醫學、農業等經濟價值，如大量利用微生物製造抗生素、抗過敏藥、抗癌藥物、殺蟲劑、維他命以及一些酵素等。由於牽涉到相當龐大的經濟利益，所以各國都開始投入大量經費，資助生物學家研究土壤中的生物多樣性（Soil biodiversity）。雖然如此，現階段對於土壤生物多樣性的瞭解仍然不多，由於土壤中的生物大多數為肉眼無法看見的微生物，研究並不容易。目前估計地球上被認知的微生物約 1% ~ 5%，而剩下 95% 以上的微生物，絕大部份存在於土壤中，此外，並預測土壤中有 150 萬種真菌、30 萬種細菌、40 萬種線蟲，以及約 4 萬種原生動物，比地球上其他環境的生物多樣性要高很多，由此可見土壤的複雜度非常高^[1]。

在目前許多農業土壤污染相關研究中，大多數利用分離培養方式挑選出存於污染土壤中之微生物，再藉由純菌株分析出可能負責代謝特定污染物之微生物並推估這類微生物存在污染場址中的數量及其生理特性，顯少提及直接利用環境樣本之微生物針對功能性基因定性之方法。然而，實際上土壤環境複雜性高，且土壤微生物僅 1% 可被培養^[2-3]，此特性對於利用生物處理土壤污染困難度提升許多，若要有效地達到生物處理目的，不但要有適合的微生物種類存在，更必須保有健康的微生物族群，才能在後續農地使用上發揮其正常的作用，因此本研究針對農業污染土壤場址，選定和美鎮一帶污染農地進行分析，嘗試利用功能性基因結合演化基因來分析農業土壤微生物社會結構，期能建立農業土壤微生物族群多樣性之評估方式，研究成果將可提供未來農地土壤污染整治技術及策略之依據。

二、結果與討論

1. 樣品來源

本研究之樣品取自位於台灣中部地區和美鎮嘉詔段，污染面積約 0.05 公頃之農地土壤樣品，土樣基本資料如表 1 所示。

表 1 土樣基本資料

採樣編號	採樣深度 (cm)	重金屬含量分析 (mg/Kg)					
		Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
1091	0-15	1.02	43.12	37.36	100.49	43.12	158.63
1105	0-15	1.40	46.62	48.63	127.90	23.68	175.47
1097	0-15	1.09	42.78	40.16	114.63	22.84	155.46

2. 以 16S rDNA 直接分析農業土壤環樣之微生物多樣性

土壤樣本經由萃取 total genomic DNA 後，以 16S rDNA 專一性引子對 (968f-gc 和 1392r) 進行聚合酶鎖反應(PCR)，所獲得的 PCR 產物，並以 1.5% 之 agrose gel electrophoresis 進行分析，依其結果可先證實所獲得的序列為目標序列。

將確定含有目標序列之各土壤樣本 PCR 產物，進行變性梯度凝膠電泳分析微生物多樣性，其結果如圖 1(A)及(B)所示。可發現樣本編號 1091 所獲得的 bands 數量較少，且主要優勢菌群與其他兩個土樣明顯不同。理論上，由 DGGE 所獲得的單一 band 為一種菌株，而所獲得的 bands 數量可代表土壤環境樣本中含有之細菌種類；另配合土樣基本資料可知，樣本編號 1091 與樣本編號 1097 及樣本編號 1105 明顯不同在於土壤重金屬鉛含量，樣本編號 1091 中的土壤重金屬鉛含量明顯較其他土樣重金屬鉛含量多約 2 倍，故初步推測土壤重金屬含量為影響土壤環境樣本之微生物族群多樣性之主因。

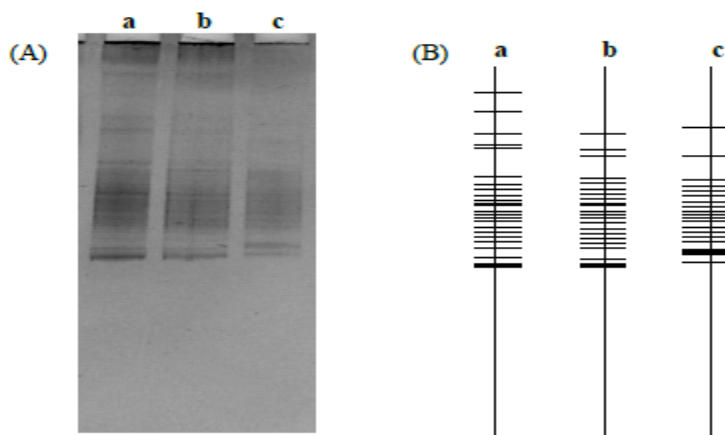


圖 1 以 16S rDNA 分析土壤環境樣本(A) DGGE 分析結果、(B) DGGE 分析各土壤樣本結果示意圖；a1097、b1105、c1091

3. 以氨氧化酵素基因(amoA)進行農業土壤樣品之微生物多樣性分析

為使農作物生長良好，早期農民們大部分選用氮肥及磷肥添加致使農業土壤中氮含量較其他土壤高，因此氮循環為農地土壤中主要代謝機制。一般硝化作用是指微生物在好氧的環境下，將氨氮轉換成硝酸鹽氮之機制，主要參與其中的微生物族群有兩大類：在硝化作用初期氨氧化菌會先將氨氮氧化成亞硝酸鹽氮，而亞硝酸鹽氮轉變為硝酸鹽氮的過程則是由亞硝酸鹽氧化菌所完成。由於氨氧化作用是硝化作用的最初反應，系統中若沒有亞硝酸鹽氮產生，後續之硝化反應也就不會發生，因此本研究在硝化菌族群的分析上，選擇硝化作用最初期參與反應的氨氧化菌進行研究。實驗選用針對 ammonia mono-oxygenase 之 amoA gene 引子對，利用 PCR 分析系統中氨氧化菌之存在與否，而目前所知之氨氧化菌大部分分佈在 Betaproteobacteria 綱中(少部分屬於 Gamaproteobacteria 綱)^[4~6]。

首先將土壤樣本經由萃取 total genomic DNA 後，以氨氧化酵素基因 amoA1F 與 amoA2R 引子對進行聚合酶鎖反應(PCR)，所獲得的 PCR 產物，並以 1.5% 之 agarose gel electrophoresis 進行分析，證實所獲得的序列為目標序列。其次，將確定含有目標序列之各土壤樣本 PCR 產物，進行變性梯度凝膠電泳分析微生物多樣性，其結果如圖 2 所示。藉由功能性基分析得知樣本編號 1097(如圖 2(A))及編號 1091(如圖 2(B))所獲得的 bands 數量相似，且主要氨氧化菌菌群相同。由於 DGGE 所獲得的單一 band 為一種菌株，所獲得的 bands 數量可代表土壤環境樣本中所含有之氨氧化菌種類數量；另配合土樣基本資料可知編號 1091 與編號 1097 之土壤重金屬鉛含量比較(如表 1)，編號 1091 之土壤重金屬鉛含量明顯比編號 1097 之土壤樣本含量多約 2 倍，但經由 PCR-DGGE 分析 amoA gene 結果發現，實際上存在於土壤環境樣本之氨氧化菌族群相同，因此初步推測土壤重金屬含量對於土壤環境樣本之氨氧化菌族群多樣性影響不大。

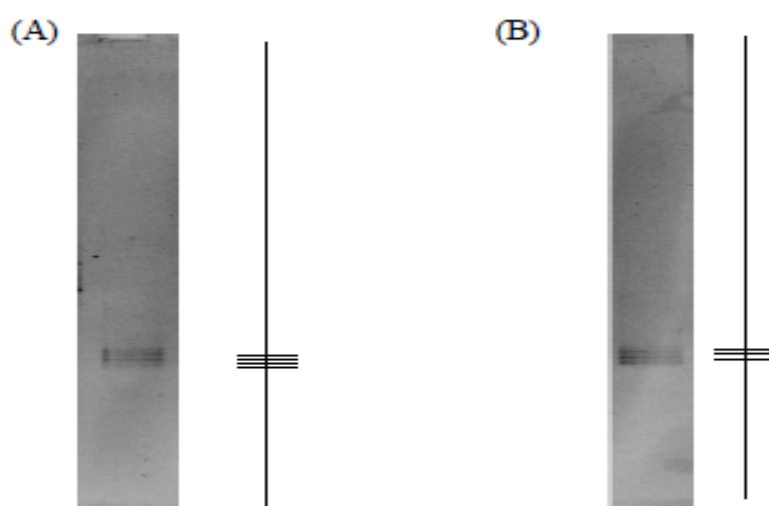


圖 2 以 DGGE - amoA gene 分析土壤樣本結果及示意圖(A)土壤樣本編號 1097、(B)土壤樣本編號 1091

由於土壤樣本具有獨立性及特異性，因此，針對受污染土壤之微生物多樣性背景分析有其困難性需克服，以往常利用 16S rDNA 作為不同微生物族群多樣性分析技術^[7-9]，亦有相關研究針對功能性基因進行微生物多樣性分析進行探討^[10-12]，但大多先藉由培養過後之樣本，再進行土壤相關研究。此外，對於硝化系統中氨氧化菌族群之分子生物技術，多利用針對氨氧化酵素(ammo)基因之引子對來進行監測，然而本研究利用 amoA 基因分析樣本結果顯示負責將氨氮氧化的氨氧化菌種類並不多，反而是以 16S rDNA 分析土樣中微生物族群多樣性較高，由於相關研究指出針對 16S rRNA 序列與功能性基因(ammoA)分析氨氧化菌顯示，大部分的氨氧化菌族群並不能夠被 amoA gene 分析出來^[13]，因此推測土壤環境樣本中的氨氧化菌族群可能較為複雜，且有許多參與氨氧化的族群未被增殖出，由本研究結果顯示，對於受污染之土壤環境樣本其氨氧化菌種類可能不是一般所認知的自營性硝化菌，若單純利用氨氧化酵素的功能性基因分析並無法完全顯示硝化族群的種類，由此可知結合功能性基因及演化基因分析將有助於受污染土壤之微生物族群多樣性背景調查，而本研究將持續進行以兩種分析技術鑑別之菌種，有待定序結果比對方能更進一步探討受污染土樣之微生物族群歧異度及其微生物組成變化。

三、結論

本研究結合 16S rDNA 及功能性基因- amoA gene 針對農業土壤環境樣本進行微生物族群多樣性分析，透過 PCR-DGGE 方法得知利用功能性基因分析農業土壤環境樣本微生物族群可提供與利用 16S rDNA 專一性引子分析微生物族群多樣性不同的訊息，幫助瞭解土壤環境中複雜的微生物族群，有鑑於此，本技術對於土壤微生物族群多樣性資料庫建立有所助益，於實際應用方面而言，將來若能再配合 Real-time PCR 分析各土樣中微生物族群之功能性基因表現量多寡，更可提供未來農地土壤污染整治技術及策略之依據。

四、參考文獻

1. 颺如思，被遺落的一環：土壤生態系中的生物多樣性，台北 (2004)
2. Amann, R.I., W. Ludwig, and K.H. Schleifer, "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation," *Microbiol. Rev.*, Vol. 59, No.1, pp. 143-169 (1995).
3. Saleh-Lakha, S., M. Miller, R.G. Campbell, K. Schneider, P. Elahimanesh, M.M. Hart, and J.T. Trevors, "Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges," *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 63, No.1, pp. 1-19 (2005).

4. Head, I.M., W.D. Hiorns, T.M. Embley, A.J. McCarthy, and J.R. Saunders, "The Phylogeny of Autotrophic Ammonia-oxidizing Bacteria as Determined by Analysis of 16S Ribosomal RNA Gene Sequences.," *Journal of General Microbiology*, Vol. 139, pp. 1147-1153 (1993).
5. Teske, A., E. Elm, J.M. Regan, S. Toze, B.E. Rittmann, and D.A. Stahl, "Evolutionary Relationships among Ammonia- and Nitriteoxidizing Bacteria.," *Journal of Bacteriology*, Vol. 176, pp. 6623-6630 (1994).
6. Ehrich, S., B. Behrens, A. Lebedeva, W. Ludwig, and E.J. Bock, "A New Obligate Chemolithoautotrophic Nitrite-oxidizing Bacterium *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and Its Phylogenetic Relationship.," *Archives of Microbiology* Vol. 164, pp. 16-23 (1995).
7. Muyzer, G., E.C. De Waal, and A.G. Uitterlinden, "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA," *Applied and Environment Microbiology* Vol. 59, No.3, pp. 695-700 (1993).
8. Sandaa, R.-A., O. Enger, and V. Torsvik, "Abundance and Diversity of Archaea in Heavy-Metal-Contaminated Soils," *Applied and Environment Microbiology*, Vol. 65, No.8, pp. 3293-3297 (1999).
9. Nakatsu, C.H., N. Carmosini, B. Baldwin, F. Beasley, P. Kourtev, and A. Konopka, "Soil Microbial Community Responses to Additions of Organic Carbon Substrates and Heavy Metals (Pb and Cr)," *Applied and Environment Microbiology*, Vol. 71, No.12, pp. 7679-7689 (2005).
10. Peixoto, R.S., H.L.C. Coutinho, B. Madari, P.L.O.A. Machado, N.G. Rumjanek, J.D. Van Elsas, L. Seldin, and A.S. Rosado, "Soil aggregation and bacterial community structure as affected by tillage and cover cropping in the Brazilian Cerrados," *Soil and Tillage Research*, Vol. 90, No.1-2, pp. 16-28 (2006).
11. Rossi, F., F. Dellaglio, and S. Torriani, "Evaluation of *recA* gene as a phylogenetic marker in the classification of dairy propionibacteria," *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 29, No.6, pp. 463-469 (2006).
12. Aboim, M.C.R., H.L.C. Coutinho, R.S. Peixoto, J.C. Barbosa, and A.S. Rosado, "Soil bacterial community structure and soil quality in a slash-and-burn cultivation system in Southeastern Brazil," *Applied Soil Ecology*, Vol. 38, No.2, pp. 100-108 (2008).
13. Purkhold, U., A. Pommerening Roser, S. Juretschko, M.C. Schmid, H.P. Koops, and M. Wagner, "Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and *amoA* Sequence Analysis: Implications for Molecular Diversity Surveys. ," *Applied and Environment Microbiology* Vol. 66, pp. 5368-5382 (2000).