

國立台灣大學生物資源暨農學院農業化學系

博士論文

Department of Agricultural Chemistry

College of Bio-resources and Agriculture

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

除草劑丁基拉草對稻田土壤微生物

多樣性與固氮作用影響之研究

Effects of the Herbicide Butachlor on Soil Microbial
Community and on Nitrogen Fixing Ability in Paddy Soil

陳玟瑾

Wen-Ching Chen

指導教授：王一雄 博士

顏瑞泓 博士

Advisor: Yei-Shung Wang, Ph. D

Jui-Hung Yen, Ph. D

中華民國 97 年 6 月

June, 2008

國立臺灣大學博士學位論文 口試委員會審定書

除草劑丁基拉草對稻田土壤微生物
多樣性與固氮作用影響之研究

Effects of the Herbicide Butachlor on Soil Microbial Community and on
Nitrogen Fixing Ability in Paddy Soil

本論文係陳玟瑾君 (D91623405) 在國立臺灣大學農業化學系完成之博士學位論文，於民國 97 年 6 月 24 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

王一雄

(簽名)

王一雄 教授 (指導教授)

林鴻淇

林鴻淇 教授

張碧芬

張碧芬 教授

鍾仁賜

鍾仁賜 教授

顏瑞泓

畢修平 博士

畢修平

劉秀美 教授

劉秀美

顏瑞泓 教授

李連源

(簽名)

系主任

摘要

丁基拉草 (*N*-butoxymethyl-2-chloro-2',6'-diethylacetanilide) 為水田中使用廣泛的除草劑，其快速降解及低毒性的特性使其成為具環境親和性的農藥選擇。本研究探討丁基拉草施用對非培養法 (Culture-independent Method) 及培養法 (Culture-dependent Method) 所得細菌族群組成及固氮活性的影響。結果顯示，水稻成活期時，於水田上層 (0-3 cm) 土壤中，兩種濃度 (1.5 g are^{-1} 及 15 g are^{-1}) 的丁基拉草施用皆能顯著的提高土壤的固氮活性。但在水稻成熟期時，只有高濃度的丁基拉草施用可以提升土壤的固氮活性。於水田下層 (3-15 cm) 土壤中，兩種濃度的丁基拉草施用皆能顯著的提高土壤的固氮活性，並且於水稻成熟期時，高濃度的丁基拉草施用較低濃度丁基拉草施用更能顯著地促進土壤固氮作用。由分析變性梯度凝膠電泳圖譜 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, 簡稱 DGGE) 所得之不加權平均連結法 (Un-paired Group Method Using Arithmetic Averages, 簡稱 UPGMA) 圖譜結果得知，與對照組相比，微生物族群多樣性的變化在固氮菌族群中約為 33-64 %，在細菌族群中約為 28-52 %。為更進一步演繹集群分析結果，採用最小距離法 (Minimum Distance, 簡稱 MD) 決定 UPGMA 圖譜的分群數目，所得結果顯示，丁基拉草的施用可影響游離固氮菌及真細菌菌族群之菌相組成，且經 100 天的水稻種植期後，未能恢復成原有的菌相狀態。高倍丁基拉草施用下，上層土壤中的可培養性優勢固氮菌種可能為 *Janthinobacterium* sp.，而在下層土壤中，則為 *Arthrobacter* sp.。在第 39 天時，固氮菌的族群種類多樣性增加，也因此造成土壤固氮作用的提升。

關鍵字：丁基拉草、變性梯度凝膠電泳、固氮活性、細菌族群多樣性、UPGMA

Abstract

Butachlor (*N*-butoxymethyl-2-chloro-2',6'-diethylacetanilide), one of the widely utilized herbicides in paddy fields, characterizes by its fast degradation rate and low toxicity and serves to be a herbicide that fulfills environmental friendliness purpose. The bacterial composition under butachlor application with rice plant cultivation was investigated by culture-independent and culture-dependent method and the change of nitrogenase activities under the same treatment were also investigated. The results showed that in the upper layer of paddy soils (0-3 cm), both concentrations of butachlor application (1.5 g are⁻¹ and 15 g are⁻¹) could significantly raise soil nitrogenase activities at rice survival stage. But at the rice ripening stage, only higher concentration of butachlor application could raise the soil nitrogenase activity significantly. In the lower layer of paddy soils (3-15 cm), both concentrations of butachlor could raise soil nitrogenase activities, while higher concentration of butachlor could raise the activity to a larger degree. From the results of un-paired group method using arithmetic averages (UPGMA) which interpreting the results of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), the diazotrophic divergences upon butachlor application were ranged from 33-64% throughout rice growth stages; while that of eubacterial diversities were from 28-52%. For further interpretation and determination of the cluster numbers of each UPGMA dendrograms, minimum distance statistics (MD), was therefore applied. The results showed that the application of butachlor altered the composition of diazotrophic and

eubacterial communities without recovery to the inceptive state after 100 days of rice cultivation. The predominant nitrogen fixation bacteria was *Janthinobacterium* sp. under higher dose of butachlor in upper layer soil, and was *Arthrobacter* sp. in lower layer soil. The diazotrophic biodiversity increased after 39 days and was the reason that boosted the soil nitrogenase activity.

Keyword: butachlor; DGGE; nitrogenase activity; bacterial biodiversity;
UPGMA



目錄

摘要.....	I
ABSTRACT.....	II
目錄.....	IV
圖目錄.....	VI
表目錄.....	IX
附錄目錄.....	X
一、前言.....	1
二、文獻回顧.....	4
(一) 農藥使用下之環境與土壤微生物多樣性.....	4
1. 農藥使用.....	4
2. 農藥與環境的關係.....	6
3. 農藥與微生物生態的關係.....	7
4. 農藥於水田的施用.....	10
(二) 丁基拉草之特性.....	11
1. 一般特性.....	11
2. 丁基拉草的降解與分佈情形.....	13
3. 丁基拉草對生態環境的影響.....	15
(三) 稻田土壤中的固氮作用與固氮微生物.....	16
1. 稻田裡的固氮作用與游離固氮菌.....	16
2. 控制固氮作用的基因.....	19
3. 固氮作用與丁基拉草.....	22
(四) 本研究相關之生物技術.....	23
1. 聚合酶鏈鎖反應.....	23
2. 變性梯度凝膠電泳.....	24

(五)電泳圖譜結果的集群分析.....	26
1. 集群分析.....	26
2. 集群數的決定.....	30
三、材料與方法.....	31
(一) 材料.....	31
(二) 方法.....	36
四、結果與討論.....	52
(一) 丁基拉草施用下土壤固氮活性的改變.....	52
(二) 丁基拉草施用下土壤游離固氮菌相的改變(非培養法).....	57
(三) 丁基拉草施用下土壤真細菌菌相的改變(非培養法).....	69
(四) 以 MD 統計量決定 UPGMA 圖譜的群數.....	73
(五) 丁基拉草施用下土壤游離固氮菌的族群變化(可培養法).....	76
(六) 丁基拉草施用下土壤真細菌的族群變化(可培養法).....	86
五、結論.....	93
參考文獻.....	95
附錄.....	107

圖目錄

圖 1.1	台灣省水田旱田耕地面積比率圖.....	3
圖 2.1	除草劑丁基拉草之化學結構.....	11
圖 2.2	除草劑於台中砂壤土及桃園黏壤土土壤管柱分佈之模式預測 及實際量測值.....	14
圖 2.3	聚合酶鏈鎖反應示意圖.....	23
圖 3.1	本研究所採用之坡堵系水田土壤.....	31
圖 3.2	丁基拉草之標準曲線.....	32
圖 3.3	水稻種植過程.....	37
圖 3.4	PCR 反應溫度控制圖.....	41
圖 4.1	本研究中 PCR-DGGE 圖譜之標準分子尺.....	59
圖 4.2	<i>Microbacterium</i> sp. 之核酸定序電泳結果.....	60
圖 4.3	<i>Arthrobacter</i> sp. 之核酸定序電泳結果.....	61
圖 4.4	<i>Paenibacillus borealis</i> 之核酸定序電泳結果.....	62
圖 4.5	<i>Rhodococcus erythropolis</i> 之核酸定序電泳結果.....	63
圖 4.6	Unidentified 菌株之核酸定序電泳結果.....	64
圖 4.7	於不同鎂離子濃度下，進行 PCR 反應擴增土壤 DNA 之 16S rDNA 片段後，以 1% agarose 電泳分析之結果.....	65
圖 4.8	不同濃度丁基拉草處理下，第 7、37、67 及 100 天上層稻田 土壤中之 <i>nifH</i> 基因片段的 (A) PCR-DGGE 圖譜及 (B) UPGMA 樹狀圖.....	66
圖 4.9	不同濃度丁基拉草處理下，第 7、37、67 及 100 天下層稻田 土壤中之 <i>nifH</i> 基因片段的 (A) PCR-DGGE 圖譜及 (B) UPGMA 樹狀圖.....	68

圖 4.10	不同濃度丁基拉草處理下，第 7、37、67 及 100 天上層稻田土壤中之 16S rDNA 基因片段的 (A) PCR-DGGE 圖譜及 (B) UPGMA 樹狀圖.....	71
圖 4.11	不同濃度丁基拉草處理下，第 7、37、67 及 100 天上層稻田土壤中之 16S rDNA 基因片段的 (A) PCR-DGGE 圖譜及 (B) UPGMA 樹狀圖.....	72
圖 4.12	以 MD 的結果決定 UPGMA 分群的數目。.....	75
圖 4.13	水稻種植第 7 天 (A) 及第 39 天 (B) 時，15 g are ⁻¹ 丁基拉草施用對土壤真細菌及固氮菌之菌數影響。.....	80
圖 4.14	水稻種植第 7 天時，由上層土壤 (0-3 cm) 中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are ⁻¹ 丁基拉草施用下之具有固氮潛力的細菌族群。.....	82
圖 4.15	水稻種植第 7 天時，由下層土壤 (3-15 cm) 中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are ⁻¹ 丁基拉草施用下之具有固氮潛力的細菌族群。.....	83
圖 4.16	水稻種植第 39 天時，由上層土壤 (0-3 cm) 中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are ⁻¹ 丁基拉草施用下之具有固氮潛力的細菌族群。.....	84
圖 4.17	水稻種植第 39 天時，由下層土壤 (3-15 cm) 中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are ⁻¹ 丁基拉草施用下之具有固氮潛力的細菌族群。.....	85
圖 4.18	水稻種植第 7 天時，由上層土壤 (0-3 cm) 中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are ⁻¹ 丁基拉草施用下之細菌族群。.....	89
圖 4.19	水稻種植第 7 天時，由下層土壤 (3-15 cm) 中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are ⁻¹ 丁基拉草施用下之細菌族群。.....	90

- 圖 4.20 水稻種植第 39 天時，由上層土壤 (0-3 cm) 中分離、培養並
鑑定控制組與 15 g are^{-1} 丁基拉草施用下之細菌族群。..... 91
- 圖 4.21 水稻種植第 39 天時，由下層土壤 (3-15 cm) 中分離、培養
並鑑定控制組與 15 g are^{-1} 丁基拉草施用下之細菌族群。..... 92



表目錄

表 2.1	常用分子生物技術縮寫表.....	9
表 2.2	禾本科相關之游離固氮菌種.....	18
表 2.3	<i>Azospirillum</i> 屬之固氮、氮同化及調節作用的相關基因及其對 應功能.....	21
表 2.4	常用相似度參數表.....	27
表 3.1	水稻種植及取樣時間日程表.....	38
表 3.2	本研究中所使用的引子.....	40
表 3.3	PCR 反應試劑成分.....	40
表 3.4	本研究所使用之無氮培養基成分表.....	43
表 3.5	不同濃度之 Acrylamide/Bis 所能分離之核酸長度.....	45
表 3.6	7% 之 Acrylamide/Bis 變性梯度凝膠成分.....	45
表 3.7	10% Ammonium persulfate 之成分.....	45
表 3.8	DCode 染劑之成分.....	46
表 3.9	本研究所使用之營養培養基 (NB) 成分表.....	50
表 4.1	不同濃度丁基拉草處理下，上層土壤 (0-3 cm) 於不同水稻 生長期的乙炔還原反應變化.....	55
表 4.2	不同濃度丁基拉草處理下，下層土壤 (3-15 cm) 於不同水稻 生長期的乙炔還原反應變化.....	56

附錄目錄

附錄 A	水稻種植第 7 天時所篩選出具固氮潛力之可培養性菌.....	107
附錄 B	水稻種植第 39 天時所篩選出具固氮潛力之可培養性菌.....	109
附錄 C	水稻種植第 7 天時所篩選出之可培養性菌.....	111
附錄 D	水稻種植第 39 天時所篩選出之可培養性菌.....	115



一、前言

水稻田為地球上最廣泛存在的淡水生態系之一，且為人類主要的糧食來源。根據行政院農委會 2005 年農業年報的統計資料，台灣水田耕地面積為 425,667 公頃，相較旱田面積 407,510 公頃為大（圖 1.1）。此外，由於台灣氣候高溫潮濕，施用除草劑可有效地提升農耕效率與農業產量。因此，在一般耕地施用除草劑的情形甚為普遍。但在前人研究中，有關除草劑對水田生態衝擊之相關評估研究甚少，鑑於除草劑施用於水田之普遍與必要性，深入評估其對土壤生態環境的衝擊具有其重要性與急迫性。

土壤原生態氮（Soil Indigenous Nitrogen），提供了 50% 以上水稻生長所需的氮素來源（George et al., 1992; Kundu and Ladha, 1995; Fernández-Valiente et al., 2000）。由氮素平衡及氮-15 之實驗結果可知，土壤中相當程度的氮素來自於非根瘤之游離固氮菌的固氮作用（Chalk, 1991; Mark and Craswell, 1992）。然而，除草劑的施用卻會對稻田土壤固氮作用及微生物族群產生一定程度的影響（Rao et al., 1983; Patnaik et al., 1995; Irisarri et al., 2001）。

丁基拉草（*N*-butoxymethyl-2-chloro-2', 6'-diethylacetanilide）為水稻田中被廣泛施用的萌前除草劑，前人研究中，也證實其具有高除草效率與提升稻米產量的能力（Singh and Pillsi, 1993）。但在許多研究中也顯示，水稻根圈的固氮作用因丁基拉草的施用而有增進或抑制的效果（Jena et al., 1990; Patnaik et al., 1995; Min et al., 2001）。從前，受限於研究技術的不足，無法針對非培養法（Culture-independent method）所得之微生物族群多樣性的變化情形進行研究。如今，隨著分子生物技術的進步，吾人可以更為全面且客觀的評估除草劑施用對環境所造成的衝擊。舉例來說，Amplified Fragment Length Polymorphism（AFLP）（Vandamme et al., 1996; Vanechoutte, 1996）、Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis（ARDRA）（Vanechoutte, 1996）及 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis（DGGE）（Muyzer et al., 1993; Muyzer and Smalla, 1998），即為幾種研究 DNA 圖譜的技術，可由土壤 DNA

多樣性圖譜的變化情形，得知土壤微生物族群因農藥施用所產生的總體差異。

其中，DGGE 因具有鑑別 DNA 片段中單一鹼基差異的能力，為吾人研究微生物生態變異的良好利器 (Wang et al., 2004; Chiu et al., 2005)。並且，由不同的引子，可以顯示不同微生物族群的變異情況。在本研究中，我們使用一種功能相當固定，且編碼 Mo Dependent-nitrogenase *nifH* 的基因片段 (Ueda et al., 1995) 的引子，來研究固氮細菌的多樣性。此外，為瞭解真細菌 (Eubacteria) 族群變異，我們採用針對原核細菌 V6-V8 保守片段的 16S Ribosomal 基因片段的引子，以得知一般微生物族群多樣性的變化情形。

鑑於將來對土壤微生物之利用性，本研究亦針對不同處理下，可培養性 (Culturable) 之一般菌與固氮菌進行的分離與鑑定，以與 PCR-DGGE 之結果相互比較，並進一步證實丁基拉草施用下土壤微生物的族群變異情形。

本研究以廣泛施用於台灣水田土壤的除草劑丁基拉草為研究標的，探討農藥施用對水田固氮菌及真細菌菌相產生的影響，並以此探討有機化學物質施用於土壤環境是否可能造成土壤生態環境的長期改變。另外，本研究以最小距離法 (Minimum Distance, 簡稱 MD) 決定 un-paired group method using arithmetic averages (UPGMA) 樹狀圖分群的數目，以確認不施用丁基拉草的控制組與施用丁基拉草的實驗組具有統計上分群的意義。

本論文主要內容包括一、不同濃度的丁基拉草施用下土壤固氮酵素活性的改變。二、不同濃度的丁基拉草施用下土壤固氮菌菌相的改變。三、不同濃度的丁基拉草施用下土壤真細菌菌相的改變。

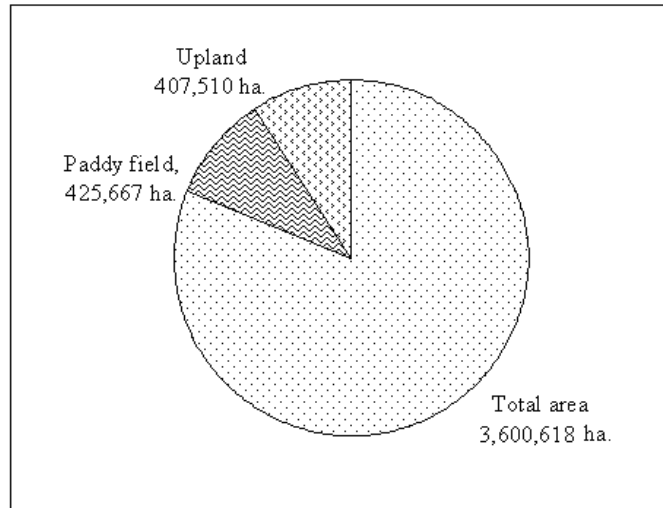


圖 1.1 台灣省水田及早田耕地面積圖（行政院農業委員會，2005）。

Fig 1.1 Cultivated land area in Taiwan.



二、文獻回顧

(一) 農藥使用下之環境與土壤微生物多樣性

1. 農藥使用

自作物的種植開始，人類便開始面臨病蟲害的問題。在 Matolcsy et al. 於 1988 年出版的「Pesticide Chemistry」書中提到，西元前 3000 年時的中國人，以石灰、木頭灰及白堊粉的混合物來防治昆蟲對保存食品的危害。大約在西元前 750 年時，希臘的著名吟遊詩人荷馬在其著名的史詩「奧德賽」中，也提到以點燃的硫磺來消毒住所。在現代，也有以辣椒水、大蒜、醋、各式精油……等等天然材料來從事田間病蟲害的防治。可見，人類嘗試以各種資材對抗病害與蟲害的侵襲所作的努力，時至今日尚未停止。

因此，第一代的農藥包括天然性植物殺蟲劑如除蟲菊精、硫酸尼古丁、魚藤酮及一些含金屬礦物如砷、銅、鉛、錳、鋅及硫等無機化合物，其取材多來自天然物質及人類對自然現象的觀察結果。此類農藥對害蟲的殺傷力不強，且對人畜的毒性較大，實用性有其限制。也因此，現代的有機農藥並非濫觴於上述非系統性的觀察，而是上個世紀中有機化學實驗室中辛勤研究後的成果。大約 1930 年左右，DDT、BHC、有機磷脂類及苯氧醋酸衍生物的幾乎在同時被發現，而成為現代農藥的始祖 (Matolcsy et al., 1988)。這類殺蟲活性高的第二代農藥使得人類的農業長足進步，並免於飢荒，從而使得人口大量增加。但伴隨而來地，使用這些有機物質所產生環境污染的問題，也逐漸受到人類的重視。但是，如果不用農藥，在殘留農藥方面，當然可以確保無農藥殘留之食品及不受農藥污染的環境，可是要達到價廉物美、鮮碩可口、量多足食的鮮果供應將是很困難的 (王, 1997)。因此，在使用各式有機化學農藥前，吾人宜以現今的生物技術評估農藥對環境的各種影響，以維護地球生態與人類健康。目前的農藥發展方向雖朝第四代農藥 (即非殺生性

殺蟲劑，包含昆蟲激素、抗保幼激素、新拒食劑、性信息素及抗幾丁物質等) 發展，然而在實用上，仍以低毒性及低殘留量的第三代農藥為主。因此，吾人更需評估該類農藥施用於環境中所造成的影響。



2. 農藥與環境的關係

1962 年 Rachel Carson 的著作「Silent Spring」發表於世，使殺蟲劑濫用的問題受到非常廣泛的重視。其實，在此之前，種種的觀察與研究也使得濫用農藥的問題漸漸浮上台面。有鑑於此，我國於 1972 年一月公布「農藥管理法」，並經 1983、1986、1988 及 2002 年度修正，禁用包含有機水銀劑、DDT、Aldrin 等可能引起長久生態危害的農藥，顯見不當的使用包含農藥在內的化學物質，已是全人類所應積極禁絕的。

現今隨著生物技術與科學的發展，更嚴格的農藥使用規範應被帶進人類的思維之中。其中幾項概念包含：一、不同種類但作用位置相同的農藥混用對目標生物具有加成的效果 (Cedergreen et al., 2007)；二、雖然藥物的作用是在安全的劑量之內，但，仍然可能對生態環境造成改變 (Wang et al., 2004)。也因此，雖然所使用的農藥種類與劑量皆在許可的範圍之內，仍可能對生態環境造成衝擊。

Butler 等 2007 年的研究中指出，生物的多樣性與生態系統的功能性是緊密相連的；而生態多樣性降低的原因往往來自於人類農業操作的增加。預測在 2050 年時，農業產量將為現今的農業產量的兩倍，但這也代表如果農業的發展不能達到保護環境的要求，將來人類所處的生態環境便會更加地惡化

Nielsen 及 Dahllöf 於 2007 年研究中，以嘉磷賽、本達隆及 MCPA 測試出海口的鰻草的生長情形、葉綠素 a 與葉綠素 b 的含量變化及 RNA-DNA 比率。結果顯示，混合農藥的施用對於該海草的影響較大，在低濃度施用時，農藥間的呈現協同作用，而在高濃度施用時，農藥間呈現對抗作用。因此，農藥的種類與施用劑量，對相同標的可能造成不同的影響。

總之，農藥的使用需要與環境保護達到相互平衡的關係。積極開發環境親和性的農藥，並客觀與精確地評估其對環境污染的層面與影響是現今農業學家的使命。

3. 農藥與微生物生態的關係

自然環境中微生物的種類繁多，這些微生物群經天擇後得以存活並對環境的生態影響頗大。由於土壤中微生物的數目相當多(每克土壤含 10^9 個微生物體)，因此對土壤生態具有相當大的重要性(王, 1997)，並可為農藥添加對於環境變異的指標之一。過去以農藥對微生物生態的影響為研究主題的文獻報告多集中在研究具降解農藥活性的微生物菌群上(El-Fantroussi, 2000; Topp et al., 2000a; Topp et al., 2000b)，但是關於農藥本身對環境中微生物的改變作用卻較少探討。近年來，由於分子生物技術的進步(表 2.1)，使科學家能更精確地評估環境微生物受到農藥等化學物質影響的情況，也使得這方面的研究結果更為充實。

Valle 等人(2006)以變性梯度凝膠電泳(Denaturing Gel Gradient Electrophoresis, DGGE)研究除草劑四唑嘧磺隆(Azimsulfuron)與微生物多樣性的關係。結果顯示雖然四唑嘧磺隆於土壤的降解速率極快，但其施用似乎的確對土壤微生物的多樣性造成變異。Shi 及 Bending(2007)同樣以變性梯度凝膠電泳研究除草劑異丙隆(Isoproturon)在不同 pH 值下對 *Sphingomonas* spp. 族群的影響，結果顯示低 pH 值下異丙隆的使用並不會對該微生物族群造成變異；但在高 pH 值下，新的 *Sphingomonas* spp. 菌株出現，並可能為降解異丙隆主要的細菌族群。

其他類似上述使用分子生物技術研究農藥對環境微生物影響的報告尚有許多(Wang et al., 2004; Chiu et al., 2005; Lee et al., 2005; Macur et al., 2007)，顯示農藥對微生物所產生多樣性的變異，已成為評估農藥對環境影響力的一個重要指標，隨著人類對於生態環境維護的重視，只要是經由人為製造的化學物質施用與排放，所造成對於地球環境的改變，均是全體人類所應注重的課題。目前常用的分子生物技術可以提供吾等對環境改變一個良好的度測指標，而本研究主要利用 PCR 結合 DGGE 的分子技術來探討微生物菌群的改變情形。

此外，自污染地區的微生物菌群中分離出具有降解環境污染物質的菌株，為環境復育的策略之一，因此，分離培養環境中的微生物菌群並評估不同培養條件下其降解農藥的情形可提供吾人從事環境復育時的參考。Liu 等人（2002）的研究中顯示 *Delftia* sp. AN3 可利用苯胺（Aniline）或乙醚苯胺（Acetanilide）為單一碳源及氮源，以支持生長所需的能量。Wang 等人（2008）添加醃胺系除草劑拉草（Alachlor）及雷蒙得（Propachlor）於施用綠肥的茶園土壤中，並篩選土壤中的菌種。結果顯示，*Bacillus silvestris*、*B. niacini*、*B. pseudomycooides*、*B. cereus*、*B. thuringiensis*、*B. simplex*、*B. megaterium* 及兩株 *Bacillus* sp. 為較為優勢的菌株，其中，*B. cereus* 降解拉草及雷蒙得的潛力最佳，而 *B. thuringiensis* 降解莫多草（Metolachlor）的潛力最佳。在本研究中，吾人亦自稻田土壤中篩選施用丁基拉草下之一般及固氮菌株，以觀察可培養性微生物菌株的歧異程度，並可作為將來環境復育及生物肥料用途的參考。



2.1 常用分子生物技術縮寫表 (Schloter et al., 2000)

Table 2.1 List of biomolecular techniques

Abbreviations	Standing for
AFLP	amplified (DNA) fragment length polymorphism
AP-PCR	arbitrary primed polymerase chain reaction (of DNA)
ARDRA	amplified ribosomal DNA restriction analysis
BOX-PCR	polymerase chain reaction of (DNA sequences between) BOX element
DGGE	denaturing gel gradient electrophoresis
ERIC-PCR	polymerase chain reaction of (DNA sequences between) enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences
FAME	fatty acid methyl ester analysis
IGS (analysis)	intergenic spacer analysis (=ITS analysis=RISA when used for ribosomal spacers)
Inter-LINE-PCR	polymerase chain reaction of (DNA sequences between) long interspersed elements
ITS (analysis)	internal transcribed spacer analysis (=RISA)
MLEE	multilocus enzyme electrophoresis
PFGE	pulsed field gel electrophoresis
PCR-RFLP	restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction-generated amplicons
RAPD-PCR	polymerase chain reaction of random-amplified polymorphic DNA
RC-PFGE	pulsed field gel electrophoresis (of DNA digested by) rare cutting endonucleases
REP-PCR	polymerase chain reaction of (DNA sequences between) repetitive extragenic palindromic elements
Rep-PCR	polymerase chain reaction of (DNA sequences between) repetitive (REP, ERIC or BOX) elements
RISA	ribosomal intergenic spacer analysis
SCAR	sequence-characterized amplified (DNA) regions
TGGE	temperature gradient gel electrophoresis

4. 農藥於水田的施用

水田與旱田的狀況主要差異為，翻地與灌水，使得水田土壤較旱田為均質，因此施用農藥的影響在水田理論上應較旱田全面且均一，對環境的衝擊亦更大。此外，由於水稻種植其間大多為浸水的水分境況，使得土壤呈現還原態，因此，其優勢的細菌族群種類以及農藥的消散、降解的情況亦與旱田不同。Song 等人於 2005 年的研究中顯示，中國福建省水田中藍綠菌數的變化受季節影響，並在九月達到最高峰。某些藍綠菌菌株只出現在水稻生長期間，而另一些只出現在水稻收成之後，顯示稻田淹水與否其土壤優勢菌株亦有所差異。

在本實驗室之先前研究中，分別施用 5 或 50 mg kg⁻¹ 的農藥於旱田土壤中，並觀察其菌相之變化，結果顯示，低濃度之農藥施用下，微生物的菌相在短期內即與控制組之菌相差異不大；但在高濃度之農藥施用下，微生物的菌相在短期內即變化甚劇，且長期觀測下，高濃度施用組與控制組之菌相差異甚大 (Wang et. al., 2004)。由此可知，高濃度的農藥施用使旱田微生物的菌相產生長期的變化。水田土壤的均質性與還原性與旱田有很大的差異，故施用農藥所產生的影響應與旱田不同，目前所知相關研究甚少，因此，本研究以除草劑丁基拉草為研究的材料，施用於水田，以觀察其對土壤微生物之影響情形。

(二) 丁基拉草之特性

1. 一般特性

丁基拉草(Butachlor) (圖 2.1)，化學名：*N*-butoxymethyl-2-chloro-2',6'-diethylacetanilide，為具選擇性的系統性除草劑，於 1971 年引進台灣，為台灣使用最廣泛的水田除草劑。熔點為 0.5-1.5 °C，沸點為 156 °C，裂解溫度為 165 °C，飽和蒸氣壓 (25 °C) 為 6.0×10^{-4} Pa，水中溶解度 20 mg L^{-1} (20 °C)，可溶於大部分有機溶劑中。本劑的水溶性低，土粒附著力強，故土壤滲漏作用輕微，淋溶深度很少超過 1-2cm，對溫度反應鈍感，適合一、二期作栽培用；雜草防除有效期達 30-40 天(邱，1985)。

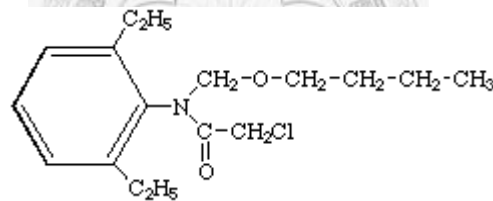


圖 2.1 除草劑丁基拉草之化學結構

Fig. 2.1 The structure of butachlor

其作用為抑制植物的蛋白質合成，主要會被植物所新生出的嫩芽所吸收，其次是植物的根部，隨後散佈至全株，而在植株的營養部位而非生殖部位累積。使用方式為萌前施用，可以控制稻田中一年生雜草及某些闊葉雜草，並於大麥、棉花、花生、甜菜、小麥及幾種芸苔屬植物的田間具選擇性。有效使用濃度為 $1.0-4.5 \text{ kg ha}^{-1}$ ，使用時的活性度與土壤有效水含量有關 (Tomlin, 2003)。

根據植物保護手冊 (2004)，欲防除插秧前雜草，每公頃田地可施用 5% 的丁基拉草粒劑 30 kg (本研究中換算為 1.5 g are^{-1} 的丁基拉草標準品)。施藥時期為插秧前 2-4 日整平田面後，保持 3-5 cm 水深，將藥劑直接均勻灑佈，

保持灌水至插秧。插秧當日排水，插秧後灌水 3-5 cm 保持 3-5 日。可防除水稗、鴨舌草、球花蒿草、母草、紅骨草、牛毛氈及螢蘭等水田雜草。



2. 丁基拉草的降解與分佈途徑

Duseja 及 Holmes (1978) 的研究中指出，丁基拉草於土壤中的降解遵循一次動力模式。張等人 (2001) 研究包含丁基拉草在內的醃胺類除草劑，在不同土壤中的吸附、降解及移動情形。結果顯示，於 25 °C 下，丁基拉草在未滅菌之黏壤土、壤土及砂壤土中之半衰期分別為 16、14 及 16 天。而在任一種滅菌土壤中，相對於未滅菌土的土壤，丁基拉草的降解速率都減慢許多，顯示微生物降解作用會影響除草劑的殘留。

Pal 等人 (2006) 亦提出相似的研究結果，即微生物的作用為丁基拉草降解的主要途徑，且於 90 天的實驗期間，2 cm 的土壤浸水的狀態下，土壤添加有機質可加速丁基拉草的降解作用。

另外，植物的根圈分泌物也會影響丁基拉草於土壤中的降解速率。Yu 等人 (2003) 的研究則顯示，丁基拉草於小麥根圈土壤中的降解速率較非根圈土壤中的降解速率快。施用 1 mg kg^{-1} 丁基拉草時非根圈土降解速率與根圈土降解速率常數分別為 0.0385 與 0.0902。經培養後使微生物數量增加為 $1.3 \times 10^5 \text{ CFU g}^{-1} \text{ soil}$ 的根圈土壤，其降解速率常數增加為 0.1091。因丁基拉草於植物根圈土壤中的半衰期較短，由此推測植物根圈分泌物具有增進根圈微生物族群的作用，進一步加速丁基拉草的降解速率。

Xu 等人 (2005) 研究丁基拉草在土壤中的吸附行為，結果發現，丁基拉草的吸附量與土壤有機質含量呈正相關；不同有機質其吸附容量亦各不相同，而又與其羰基的含量成正比。張等人 (2001) 以模式模擬丁基拉草於土壤中的移動，結果發現其移動性不高，到達 3 公尺或 10 公尺的地下水層需時 82–309 年，且其到達地下水層之殘留量為 0，故對地下水層污染的可能甚低。Chiang 等人 (2001) 亦研究三種水田除草劑：丁基拉草、殺丹及甲氧基護谷於砂質壤土及黏壤土中的移動情形。結果顯示，丁基拉草可以移動分佈至土壤管柱之各部位 (0-10 cm) (圖 2.2)，但不同的土壤性質下其移動性也不相同。

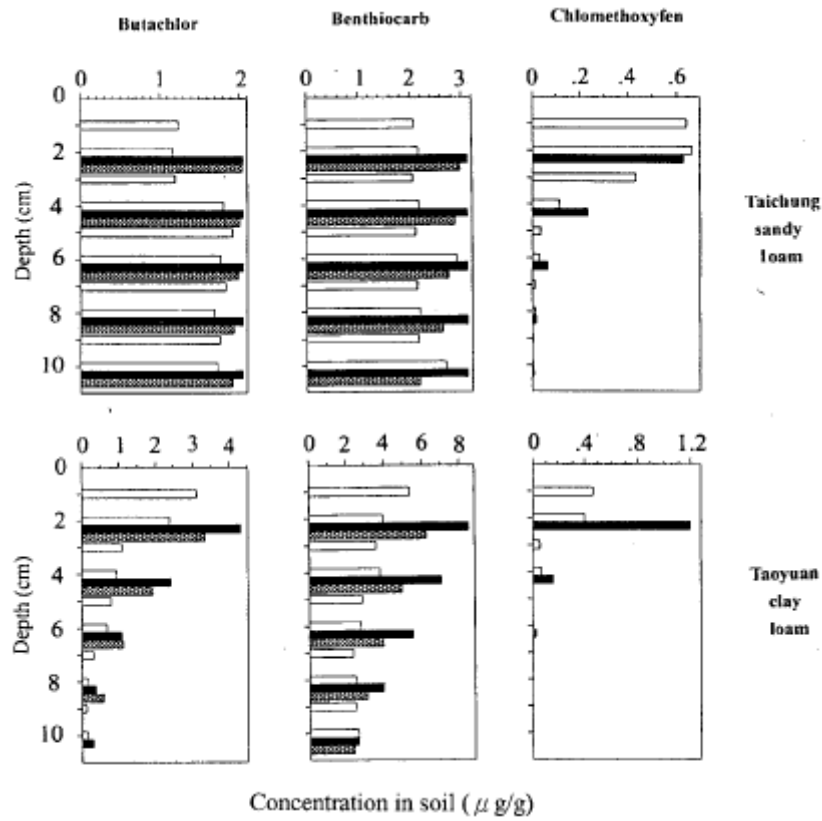


圖 2.2 除草劑於台中砂壤土及桃園黏壤土土壤管柱分佈之模式預測及實際量測值 (Chiang et al., 2001)

□ 實際量測值; ■ 平衡模式預測值; ▨ 動力模式預測值.

Fig 2.2 Predicted and measured residues and distribution of herbicide in the Taichung sandy loam and Taoyuan clay loam soil columns.

□ Measured; ■ Calculated by equilibrium models; ▨ Calculated by kinetic models.

3. 丁基拉草對生態環境的影響

雖然前人的研究結果顯示丁基拉草對於地下水層的污染機率甚低，Tsumura (1994) 提出的研究報告中，指出自來水中存在丁基拉草的事實，顯示丁基拉草的確可能在不覺中散佈於水循環之中。另外，施用於土壤表面的丁基拉草對環境中其他生物是否產生突變病害或多樣性的改變也尚待科學家的研究證實。

Ateeq 等人 (2002) 利用洋蔥 (*Allium cepa*) 為研究材料，進行五氯酚、2, 4-D 及丁基拉草的點狀突變試驗，結果發現，雖然丁基拉草使洋蔥產生型態變異的比率是三者間最低的，但是，在很低的濃度下 (5.13 ppm)，丁基拉草即會造成研究材料的基因變異，於有絲分裂之中期及後期所產生的細胞變異數量，也是三種施用藥品中最高的，因此丁基拉草可說是強有力的紡錘體抑制物質。

1993 年 Singh 及 Pillsi 將丁基拉草施用於稻田中，結果可有效防除雜草及增加稻米產量，但施用丁基拉草的土壤，不論是在其微生物菌相，或是其酵素活性均受到改變。Hang 等人 (2001) 於稻田中施用丁基拉草，結果發現，放線菌數量顯著減少，而細菌及真菌的數量增加。

由以上研究可知，丁基拉草的施用對土壤微生物菌相及植物的生長均可能有一定程度的影響。本研究所關注的微生物菌相方面，礙於從前技術的限制，無法對其多樣性的變化情形進行有效的評估，以現今的分子生物技術可以更真實的評估施用丁基拉草對微生物菌相組成的變化情形。

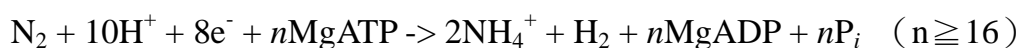
(三) 稻田土壤中的固氮作用與固氮微生物

1. 稻田裡的固氮作用與游離固氮菌

稻米提供了全球約二分之一的人口主要的糧食來源，為維持水田的永續耕作與減低氮肥對地下水層的污染，自 19 世紀中，科學家們即陸續對稻田中的固氮作用加以研究 (Watanabe et al., 1951; Moore, 1966; Balandreau et al., 1975)。Quesada 等人 (1997) 的研究結果顯示，稻田中的生物固氮作用 (Biological Nitrogen Fixation) 每作每公頃可貢獻 75 kg 的氮素；而於培養基中，每公頃亦可貢獻相當於 8 到 30 kg 的氮素。由於其效能甚高，固氮作用為許多科學家所欲積極開發與應用的標的。在游離固氮菌中，首先被報導的菌株為 Azotobacters (Clark and Durrell, 1965)；表 2.2 為前人研究中所分離出的某些游離固氮菌種。

固氮作用受到兩大因子限制，其一是氧氣的濃度。因為固氮作用由絕對厭氧菌、兼性需氧菌、微嗜氧生物及絕對好氧菌等作用，而此等生物從事固氮作用時需要保護其在氧氣中不穩定 (Oxygen-labile) 的蛋白質 (Tate, 1995)。其二是土壤銨離子的濃度。因為銨離子可能會抑制 ADP 核糖化作用 (ADP-ribosylation) (Fu and Burris, 1989; Klassen et al., 1997)，從而抑制固氮作用的進行。另外，因為固氮作用受到轉錄啟動子 NifA 蛋白的調控，而此調控機制與環境中的氧氣濃度與固定態氮含量有關，也因此，改變土壤中的氧氣濃度及銨離子濃度可以改變土壤中固氮作用的效能。

禾本科的游離固氮微生物的種類可分為以下三種，一、根圈微生物 (Rhizosphere Organisms)，二、兼性內生 (Facultative Endophytes)，及三、絕對內生 (Obligate Endophytes) (Baldani et al., 1997)。其作用式如下：



(Halbleib and Ludden, 2000)

其中，近年來所發現包含 *Acetobacter diazotrophicus*、*Herbaspirillum* spp 及 *Azoarcus* spp 在內的絕對內生固氮菌，因其能於植體內部繁殖以避免外部氧氣濃度及環境的干擾的特性，較受到科學家所重視，成為具潛力的禾本科固氮微生物群（Baldani et al., 1997）。



表 2.2 禾本科相關之游離固氮菌種 (Döbereiner et al., 1994)

Table 2.2 The endophytic free-living nitrogen-fixation bacteria in Gramineae plant tissue

Diazotroph	Plant	Plant parts
	Facultatives	
<i>Azotobacter brasilense</i>	Cereals	Roots, stems, seeds
	Forage grasses	Roots, stems
	Sugar cane	Roots, stems, leaves
	Palm trees	Roots, stems, fruits
<i>A. lipoferums</i>	Cereals	Roots, stems, seeds, xylem sap
	Forage grasses	Roots, leaves
	Sugar cane	Roots, stems, leaves
	Tuber plants	Tubers, roots
	Palm trees	Roots, stems, fruits
<i>A. amazonense</i>	Cereals	Roots, stems, seeds
	Sugar cane	Roots, stems
	Palm trees	Roots, stems, fruits
<i>A. irakense</i>	Rice	Roots
	Obligates	
<i>H. seropedicae</i>	Cereals	Roots, stems, leaves, seeds
	Sugar cane	Roots, stems
	Forage grasses	Roots, stems, leaves
	Palm trees	Roots, stems
<i>H. rubrisubalbicans</i>	Sugar cane	Roots, stems, leaves
	Rice	Roots, stems, leaves
<i>A. diazotrophicus</i>	Sugar cane	Roots, stems, leaves
	Pennisetum	Roots, stems,
	Sweet potato	Roots, stems, tubers
<i>Azoarcus</i> spp.	Kallar grass	Roots, base of stems
<i>Burkholderia</i> spp.	Cereals	Roots, stems, leaves
	Sugar cane	Roots, stems, leaves
	Tuber plants	Roots, tubers
	Palm trees	Roots, stems

2. 控制固氮作用的基因

固氮菌的固氮作用需要固氮基因的啟動及相關基因的調控。本研究針對固氮基因的保守序列作不同游離固氮菌種的劃分，期能探討丁基拉施用下稻田土壤中固氮細菌多樣性的變異。以下簡介固氮基因及其調控作用。*nif* 固氮基因為固氮微生物中保守的基因序列，於 *Azospirillum* 菌屬中，其基因與對應之功能如表 2.3。Steenhoudt 及 Vanderleyden 於 2000 年的研究中歸納整理游離固氮微生物之固氮行為，結果發現，*Azospirillum* sp.、*Acetobacter diazotrophicus*、*Herbaspirillum seropedicae*、*Azoarcus* sp. 及 *Azotobacter* sp. 其 *nif* 基因表現均需要 *nifA* 轉錄活化子的啟動，而 *nifA* 轉錄活化子的表現受到氧分壓及固定化氮濃度等環境因子調控。但是，幾乎所有的固氮微生物，其 *nif* 基因的結構、表現及調控的方式均不盡相同。對 *Azospirillum brasilense* 及 *H. seropedicae* 而言，過量的銨迴饋抑制 *nifA* 基因的表現；而對 *Azotobacter vinelandii* 而言，*nifA* 需與 *nifL* 基因進行共轉錄 (Cotranscription) 而 *nifL* 基因的產物於高氧分壓及高細胞銨濃度條件下抑制 *nifA* 基因的作用。

另外，*Klebsiella pneumoniae* 與 *Herbaspirillum seropedicae* 的 *nifA* 的 promoter 受到 *ntrC* 及 *rpoN* (σ^n) 的調控 (Wassem et al., 2000)；而改變氧及銨離子濃度調控 *Herbaspirillum seropedicae* 之 *nifA* 基因的表現 (Souza et al., 1999)；*Bradyrhizobium japonicum* 並受到 P_{II} 蛋白的調控 (Pedrosa et al., 1997; Benelli et al., 1997)。

nif 基因也因菌種的演化及生理，具有相異的結構與位置。在 *Klebsiella pneumoniae*，其 *nif* 基因在染色體上佔有連續 24 kbp 的長度 (Arnold et al., 1988)；而 *Enterobacter agglomerans* 的 *nif* 基因位於質體上 (Stumpf et al., 1993)。在 *Azospirillum brasilense* (Frazzon and Schrank, 1998)、*Acetobacter diazotrophicus* (Lee et al., 2001)、*Azotobacter vinelandii* (Merrick, 1993)、及共生固氮菌 (Fischer, 1994)，*nif* 基因散佈於染色體或質體上 (Merrick,

1993)。在 *Herbaspirillum seropedicae*，*nif* 基因於染色體上佔有兩個區域：一個區域包含連續的 *nifA* 及 *nifB* 基因 (Souza et al., 1991)，一個區域包含 *nifHDKENXorf 1orf 2orf 3* 操控子 (Klassen et al., 1999)，其中，*nifN* 基因為固氮酵素所必需 (Klassen et al., 1999)。

總而言之，雖然固氮基因具有不同的結構、位置與序列型態，但編碼固氮酵素鐵蛋白的 *nifH* 基因為所有的固氮菌所必需 (Poly et al., 2001)，且為最古老的固氮基因之一 (Rosado et al., 1998)。許多的研究報告結果顯示，以 *nifH* 基因序列作為固氮菌的分類，與以 16S rRNA 序列作為菌種的分類結果相符 (Ueda et al., 1995; Zehr et al., 1995; Borneman et al., 1996)。

綜上所述，不同種類的固氮微生物，其固氮基因具有相異的結構及調控方式，而其固氮的效率也差異甚大。因此在本研究中，以 DGGE 法分離不同序列的游離固氮菌，從而對其菌種多樣性作一深入的探討。



表 2.3 *Azospirillum* 屬之固氮、氮同化及調節作用的相關基因及其對應功能 (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000)

Table 2.3 *Azospirillum* genes involved in nitrogen fixation, nitrogen assimilation and nitrogen regulation

Gene	Function
<i>nifH</i>	Structural gene dinitrogenase reductase (Fe protein)
<i>nifD</i>	Structural gene dinitrogenase (MoFe protein, α -subunit)
<i>nifK</i>	Structural gene dinitrogenase (MoFe protein, β -subunit)
<i>nifA</i>	Transcriptional activator of the nitrogen fixation (<i>nif</i>) genes
<i>gltDB</i>	Glutamate synthase structural genes
<i>glnA</i>	Glutamine synthetase structural gene
<i>amtB</i>	Structural gene ammonium transporter
<i>glnB</i>	N-signal transmitter protein P _{II}
<i>glnZ</i>	P _{II} homologue
<i>glnD</i>	Uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (UTase/UR)
<i>ntrB</i>	Sensor protein of two-component regulatory system involved in general nitrogen control
<i>ntrC</i>	Regulatory protein of two-component regulatory system involved in general nitrogen control
<i>ntrA, rpoN</i>	Alternative sigma factor, σ^{54}
<i>draT</i>	Dinitrogenase reductase ADP ribosyl-transferase
<i>draG</i>	Dinitrogenase reductase activating glycohydrolase

3. 固氮作用與丁基拉草

田間施用包含農藥在內的化學藥劑可能對土壤中生物或其原有的作用（如脫氮作用、溶磷作用，及固氮作用等）產生促進或抑制的作用。

Mishra 及 Pandey (1989) 發現 100 mg mL^{-1} 的丁基拉草雖然不會使藍綠菌 *Nostoc linckia* 的生長及固氮活性產生改變，卻會使其吸收 NO_3^- 及 NH_4^+ 的能力下降。pH、有機碳源種類（葡萄糖或乳酸），及胺基酸也會調節丁基拉草對該藍綠菌的毒害。例如，較低的 pH 即會增進丁基拉草對 *N. linckia* 的毒性。Selvakumar 等人 (2002) 於施用丁基拉草的稻田土壤中分離藍綠細菌，結果發現 *Westiellopsis* 屬佔最大宗，其次是 *Anabaena*、*Nostoc* 及 *Oscillatoria*。Jena 等人 (1990) 的研究顯示，低濃度的丁基拉草可促進固氮酵素的活性。Patnaik 等人 (1995) 於每公頃農地施用 1.8 kg 的丁基拉草，結果發現，固氮酵素的活性有些微提升。Hang 等人 (2001) 施用不同濃度 (5.5 、 11 及 22 mg kg^{-1}) 的丁基拉草於稻田中，結果發現，固氮酵素活性於施用初期即提升，且施用濃度越高，其還原力越高；但在一個月後，其活性即受抑制，且濃度越高者抑制情況越顯著。顯示丁基拉草的施用的確可能對固氮菌的生態或其活性產生改變。

(四) 本研究相關之生物技術

1. 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

聚合酶鏈鎖反應為一強有力的工具，可將極少量的混合 DNA 分子加以複製，並放大其數量，以便研究環境中未被分離培養的基因序列。其原理如圖 2.3，並簡述如後。一開始系統加熱至兩段互補且黏合模版 DNA 變性分離。接著系統降溫，與模版 DNA 互補的兩段短股 DNA (引子) 分別黏合至已變性分離的兩段模版 DNA 上。在熱穩定的 DNA 聚合酶 (通常為 Taq) 的作用下，兩段引子自 3' 端開始延長，合成新的 DNA。一個 DNA 分子若重複操作 PCR 25 次，那麼 DNA 的分子數將會擴增到 2^{25} 約等於 10^6 個分子。這個 DNA 的量已足夠在洋菜凝膠 (Agarose gel) 電泳中觀察到。

目前，PCR 的技術已廣泛地應用在醫學、農學、食品、生物等學科。結合 PCR 與其他相關的分生技術，可從事 DNA 序列的直接分析，DNA 及細胞種類的分析，基因定位突變，遺傳病及病源之診斷，基因表現與選殖，水質及食品檢驗等研究。

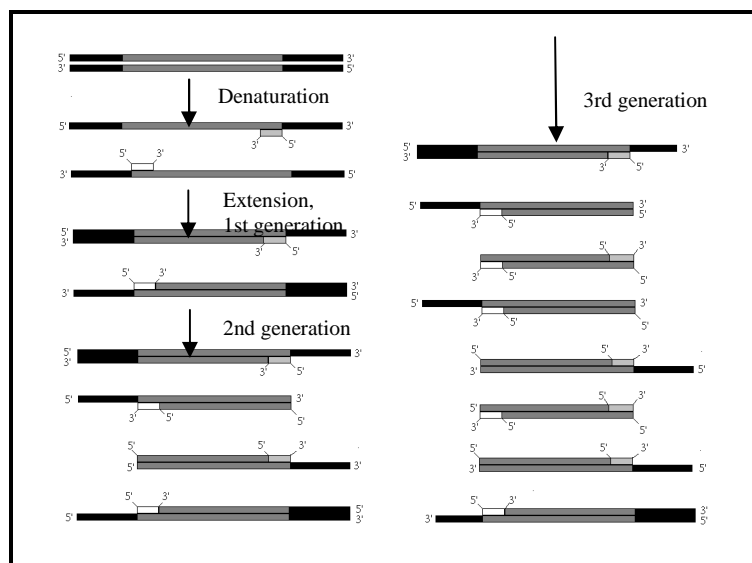


圖 2.3 聚合酶鏈鎖反應示意圖

Fig 2.3 Three cycles of the polymerase chain reaction.

2. 變性梯度凝膠電泳

變性梯度凝膠電泳 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) 是一種研究在片段基因上鹼基突變的電泳技術。早先此種技術是以用來作醫學研究為主，但 Mulyzer 等人在 1993 年將此種技術加以改良應用後，在分析環境微生物的菌群結構上，有著相當不錯的成果。結合了 PCR (Polymerase Chain Reaction) 以後的 PCR-DGGE，可將片段特定基因複製放大，再藉由 DGGE 做基因差異的分析，進而研究環境菌群結構的組成 (邱，2004)。

DGGE 原理主要是在 Acrylamide/Bis 電泳過程中，加入使雙股 DNA (Double Strand DNA, ds DNA) 變性的化學物質，像 Urea 和 Formamide 等，使得雙股 DNA 發生變性而局部或完全分離，目的使用來分離長度和大小相似，但序列不同的 DNA。因為一般的電泳分離 DNA 主要是以大小和長度等不同為主，但是對於相似大小但序列不同的雙股 DNA 沒有辦法作有效性的分離。雙股的 DNA 間，主要的鍵結力量是藉由鹼基配對的氫鍵力量所形成，其中腺嘌呤(A)與胸腺嘧啶 (T) 配對形成兩個氫鍵，而鳥糞嘌呤 (G) 與胞嘧啶 (C) 配對形成三個氫鍵。因此在 DNA 的序列當中，如果 C+G 的數量多的時候，所需要打開雙股的力量越大，亦即所需要變性劑的濃度要越高。這也就是 DGGE 所應用的基本原理，利用變性劑的濃度不同，使雙股 DNA 在通過電泳膠時，由於變性而分開改變形狀，使序列不同，但長度相同的 DNA 在不同變性劑的濃度下，打開雙股改變形狀，進而改變在電泳膠中泳動速率而分離 (Gelsomino, 1999)。

DGGE 的應用相當的廣泛，可以用來作分析混合菌群的結構組成和分佈變化，甚至可以用來篩選 Clone libraries 等。Mulyzer 等人在 1993 年的研究結果顯示，PCR-DGGE 的指紋譜 (Gene Fingerprinting) 對於 DNA 的序列變異性有相當高的靈敏性，在 DGGE 中的亮帶，每一條都代表著一個菌群落，不同的亮帶即代表著不同的菌群，因此觀察 DGGE 電泳的亮帶分佈，就可以觀察出環境中微生物的分佈及消長，進而判斷微生物菌群結構。另

外，DGGE 技術的高解析度可用於偵測點突變，如 Gürtler 等人在 2002 年的研究中，將 DGGE 技術結合核酸序列資料庫，以辨別 *Staphylococcus aureus* 的突變株。之外，改變 PCR-DGGE 所使用的引子可以針對菌群主要或次要的組成作更深入的研究 (Heuer and Smalla, 1997)。Rosado 等人在 1998 年利用 PCR-DGGE 技術探討 *Paenibacillus azotofixans* 菌株 *nifH* 固氮基因序列，結果發現，*P. azotofixans* 的 *nifH* 基因序列與其親源關係相近的菌株，如 *P. polymyxa* 及 *P. macerans* 歧異甚大，可由 DGGE 技術將其分離。

由於只有少數在自然界中存在的原核生物可於實驗中培養出來 (Wayne et al., 1987)，且不同種類的微生物其生長條件均不相同。利用 DGGE 及 TGGE 可不經培養，直接分析其核酸的組成，可以直接地瞭解菌種組成及菌株的差異，因此本研究以此技術來探討固氮微生物菌群與真細菌族群的核酸序列變化情形。



(五) 電泳圖譜結果的集群分析

1. 集群分析法

集群分析法 (Cluster Analysis) 是將一大群觀測值 (Observation) 依其相似性 (Similarity) 或同質性 (Homogeneity) 分成數群的方法，使得每群內的個體間差異小，而群體間之個體差異大 (沈，1998)。集群分析法可被分成兩個基本的部分：

(1) 相似度的量測法的選擇：

這步驟決定任兩個觀測值相互之間的相似度，若兩觀測值越相似，其同質性越高。

(2) 集群方式的選擇：

這步驟選定集群的方式，以使群體間差異大，而群體內差異小 (Härdle and Simar, 2003)。

以下依序分成兩小節說明。

(1) 相似度的量測法的選擇

由於資料型態的不同 (如量化資料、符號資料及數量與符號皆有的資料等)，相似度的量測方式也相異。DGGE 圖譜所得亮帶的資料，主要是以亮帶的有無決定資料的相似度，在統計上，屬於不連續性的二元結構 (Binary Structure)，以下以數學的方式定義：

假設有兩個觀測值 x_i 與 x_j ，其中 $x_i = (x_{i1}, \dots, x_{ip})$ ， $x_j = (x_{j1}, \dots, x_{jp})$ ； x_{ik} ， $x_{jk} \in \{0, 1\}$ 。

以下四種狀況可能成立：

$$\begin{aligned}
x_{ik} &= x_{jk} = 1, \\
x_{ik} &= 0, x_{jk} = 1, \\
x_{ik} &= 1, x_{jk} = 0, \\
x_{ik} &= x_{jk} = 0.
\end{aligned}$$

其相似度計算方式如表 2.4。

表 2.4 常用相似度參數表 (Härdle and Simar, 2003)

Table 2.4 Common similarity coefficients

Name	δ	λ	Definition
Jaccard	0	1	$\frac{a_1}{a_1 + a_2 + a_3}$
Tanimoto	1	2	$\frac{a_1 + a_4}{a_1 + 2(a_2 + a_3) + a_4}$
Simple Matching (M)	1	1	$\frac{a_1 + a_4}{p}$
Russel and Rao (RR)	-	-	$\frac{a_1}{p}$
Dice	0	0.5	$\frac{2a_1}{2a_1 + (a_2 + a_3)}$
Kulczynski	-	-	$\frac{a_1}{a_2 + a_3}$

定義

$$a_1 = \sum_{k=1}^p I(\chi_{ik} = \chi_{jk} = 1),$$

$$a_2 = \sum_{k=1}^p I(\chi_{ik} = 0, \chi_{jk} = 1),$$

$$a_3 = \sum_{k=1}^p I(\chi_{ik} = 1, \chi_{jk} = 0),$$

$$a_4 = \sum_{k=1}^p I(\chi_{ik} = \chi_{jk} = 0).$$

下面為考慮加權時的參數式

$$d_{ij} = \frac{a_1 + \delta a_4}{a_1 + \delta a_4 + \lambda(a_2 + a_3)}$$

目前一般常以 Dice 參數來計算電泳圖譜上的亮帶的相似度，其特點為將兩 Lane 皆有的亮帶得分加權，以突顯其相似的程度。

Boriollo 等人於 2006 年的報告中以多點基因座酵素電泳法 (Multi-locus Enzyme Electrophoresis, MLEE)，不同酵母菌 *Candida albicans* 菌株為研究標的，研究不同群集分析方式對 *C. albicans* 菌株分類的效果。結果顯示，以 Dice 參數結合不加權平均連結法 (Unweighted Paired-group Using Arithmetic Averaging, UPGMA) 可分別出較多菌株，因此適用於以 MLEE 鑑別 *C. albicans* 菌株的應用研究。Carrigo 等人於 2005 年的報告中以脈衝式膠體電泳 (Pulsed-field Gel Electrophoresis, PFGE)，不同金黃色葡萄球菌 *Streptococcus pneumoniae* 菌株為研究標的，研究以不同相似度參數對 *S. pneumoniae* 菌株分類的效果，結果顯示，包括 Dice 在內的四種參數對於該菌株分類的效果並無顯著差異。綜合以上前人研究結果，本論文中採用 Dice 參數計算不同實驗處理下變性梯度凝膠電泳上亮帶位置的變異，並以 UPGMA 法分類不同處理下的結果。

(2) 集群方式的選擇

集群分析法可分成摺疊集群法及非摺疊集群法兩種類型，摺疊集群法是將 n 個個體歸首先分成小群 (Small Clusters)，然後小群間較相似者再逐步合併成較大的群 (Large Clusters) (沈，1998)，每群之集群連結法尚有不同的選擇，如 UPGMA 法即為其中之一。

UPGMA (Unweighted Pair-group Method Using Arithmetic Averages) 集群法 (Michener and Sokal, 1957)，是假設不同分支的演化速度相近時，利用算數平均來表示族群間的距離，其步驟如下：

1. 以每個個體為一群，最初有 n 群，並以表 2.4 中的參數求出其兩兩間距離。

2. 將最小距離兩群合併成群 (uv)。
3. 求群 (uv) 與他群 (w) 的距離，其求法為

$$d(uv)w = \frac{\sum_i \sum_k d_{ik}}{n(uv)n(w)}$$

式中 d_{ik} 為群 (uv) 中第 i 個體與群 (w) 中第 k 個體之距離。 $n(uv)$ 及 $n(w)$ 分別為群 (uv) 及群 (w) 之項數 (沈, 1998)。

Datta 及 Datta (2006) 分別以生物及統計的方式比較不同集群方式對基因表現的數據分群的效果，結果發現，不論以生物或統計的方式評估，UPGMA 均為其中效果較佳的演算方式。

現今應用統計工具分析生物學的數據是非常普遍的，但由上述研究可知，不同的統計方法可能影響研究者對研究結果的演繹。本論文應用 Dice 參數計算各 Lane 相似度，並應用兩群間最小距離法 (Minimum Distance, MD) 來決定樹狀圖的集群數，以研究丁基拉草對生態上的影響。有關最小距離法的說明於下一段落詳細介紹。

2. 集群數的決定

集群分析法事先不知道資料可分為幾群，由其分析結果中加以推斷，其推斷的統計值有：

1. 標準偏差 (Root-mean Square Standard Deviation, RMSSTD)
2. 半淨複相關係數 (Semi-partial R Square, SPRSQ)
3. 複相關係數 (R Square, R^2)
4. 兩群間最小距離 (Minimum Distance, MD) (沈，1998)

每種判斷方法均有其特點，本研究採用 MD 參數作為 UPGMA 圖譜分群的指標。以 MD 參數對分群數目作圖，並以其轉折點 (Turning Point) 處的分群數目作為 UPGMA 圖譜分群的參考。因統計上並無對轉折點的嚴格定義，因此，在本論文中，對轉折點的定義為，當 MD 參數值產生急遽的變化時，該點即為轉折點。然而，當一圖中有多個轉折點時，需參考實驗的條件與水稻生長期以使分群結果符合實驗上的意義。

參考由 MD 參數的變化所得的結果，吾人可以得到統計上具有顯著意義的分群數目，本研究即採用此方法，判別 UPGMA 圖譜的分群數目。

三、材料與方法

(一) 材料

1. 土壤樣品及採樣地點

本研究所使用之土壤採自行政院桃園區農業改良場，為經七年以上水稻種植之水田表土（0-20 cm）其分類為坡堵系（fine, mixed, hyperthermic Typic Plinthaquults），為更新世紅土臺地堆積物質發育之紅壤。為使土壤性質均一，實驗前先將土壤風乾、壓碎後過篩（2-mm mesh）。土壤質地為砂質壤土，酸鹼值為 5.6，陽離子交換容量（Cation Exchange Capacity, CEC）為 $22.0 \pm 0.8 \text{ cmol kg}^{-1}$ 。其中，含有 68% 砂粒，17% 黏粒，及 15% 粉粒。有機碳含量 $5.07 \pm 0.09 \%$ 。全氮量 $0.188 \pm 0.008\%$ ，其中，銨態氮含量為 $15.9 \pm 1.1 \text{ mg N / kg dry soil}$ ；硝酸態氮含量為 $2.7 \pm 0.5 \text{ mg N / kg dry soil}$ 。



圖 3.1 本研究所採用之坡堵系（fine, mixed, hyperthermic Typic Plinthaquults）水田土壤，為更新世紅土臺地堆積物質發育之紅壤，大部分利用為水田。

Fig 3.1 Soil used in this research, mostly applicated as rice paddy, is derived from Pleistocene terraced deposits and classified as Potu series (fine, mixed, hyperthermic Typic Plinthaquults).

2. 丁基拉草

本研究添加之丁基拉草為商品化產品：介好治[®] (32% 乳劑，嘉泰企業股份有限公司)，由行政院農委會農業藥物毒物試驗所何明勳博士提供。另以丁基拉草標準品製作標準曲線(圖 3.2)，以確定該商品之丁基拉草含量(36.3%)。

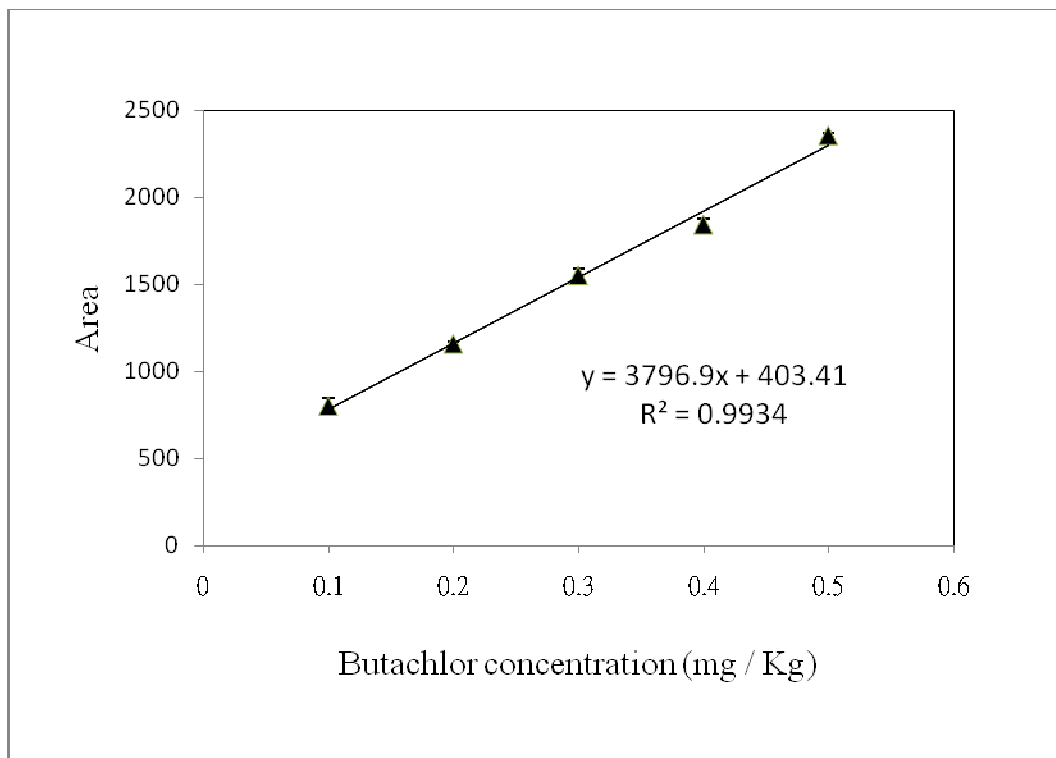


圖 3.2 丁基拉草之標準曲線

Fig 3.2 Standard curve of butachlor

3. 化學藥品

- (1) 30% 過氧化氫溶液 (H_2O_2)：日本 Kyoto 公司製。
- (2) 乙醇 (Ethanol)：德國 Merck 公司製。
- (3) 丁基拉草 (Butachlor) 標準品：德國 Dr. Ehrenstorfer-schäfers 公司製，純度 98.0%。

- (4) 介好治[®] (丁基拉草商品化產品): 台灣嘉泰企業股份有限公司製。
- (5) 生物素 (Biotin): 美國 Sigma 公司製。
- (6) 尿素 (Urea): 德國 Merck 公司製。
- (7) 氫氧化鉀 (KOH): 德國 Riedel-deHaën 公司製。
- (8) 偏磷酸鈉 (NaPO_3): 日本 Hayashi 公司製。
- (9) 硫酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): 美國 Mallinckrodt 公司製。
- (10) 硫酸錳 ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$): 德國 Merck 公司製。
- (11) 氯化鈣 (CaCl_2): 日本 Nacalai Tesque 公司製。
- (12) 氯化鈉 (NaCl): 德國 Merck 公司製。
- (13) 鉬酸鈉 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): 德國 Merck 公司製。
- (14) 葡萄糖 (Glucose): 德國 Merck 公司製。
- (15) 溴百里酚藍 (Bromothymol Blue): 德國 Riedel-deHaën 公司製。
- (16) 營養培養基 (Nutrient Broth): 德國 Merck 公司製。
- (17) 磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4): 德國 Merck 公司製。
- (18) 蘋果酸 (Malic Acid): 德國 Riedel-deHaën 公司製。
- (19) 瓊脂粉 (Agar): 德國 Merck 公司製。
- (20) 鐵-EDTA (Fe-EDTA): 美國 Sigma 公司製。
- (21) Acrylamide/Bis (Acrylamide/Bis, 37.5:1, 40%): 德國 Merck 公司製。
- (22) Agarose: 美國 Seakem 公司製。
- (23) Ammonium Persulphate (APS): 德國 Merck 公司製。
- (24) Bromophenol Blue: 美國 Bio-rad 公司製。
- (25) Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) mix: 英國 ABgene 公司製
- (26) Ethidium bromide (EtBr): 德國 Merck 公司製。
- (27) Formamide: 德國 Merck 公司製。
- (28) N,N,N,N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED): 德國 Merck 公司製。
- (29) Thermoprime Plus DNA Polymerase: 英國 ABgene 公司製。
- (30) SYBR[®] Green I: 美國 BMA 公司製。

- (31) Tris Acetate EDTA (TAE)緩衝液：美國 Sigma 公司製。
- (32) UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit：美國 MO BIO Laboratories 公司製。
- (33) Xylene Cyanol：美國 Bio-rad 公司製。

4. 氣體

- (1) 高純度氮氣：購自清豐氣體公司（21% O₂ + 79% N₂）。
- (2) 高純度氫氣：購自清豐氣體公司。
- (3) 乙炔：購自清豐氣體公司，純度 99% 以上。
- (4) 乙烯：購自清豐氣體公司。
- (5) 空氣：購自清豐氣體公司。
- (6) 混合氣體標準品：美國 Scott Specialty Gases 公司製，含乙炔 0.996%，乙烯 0.100%。
- (7) 超高純度氮氣：購自清豐氣體公司，純度 99.9995% 以上。

5. 儀器設備

- (1) 小型台式高速離心機：德國 Eppendorf 公司製，型號 5415 D。
- (2) 氣相層析儀：中國層析公司製，型號 GC9800，配備火焰離子偵測器 (Flame Ionization Detector)，層析管柱為 SUPELCO 60/80 Carboxen[®] 1000，長度 15 ft，內徑 1/8 in。
- (3) 氣相層析儀：美國 Agilent 公司製，型號 6890N，配備電子捕捉偵測器 (Electron Capture Detector, ECD)，層析管柱為 HP-5 (30 m × 0.32 mm, 0.25 μm Film Thickness, Hewlett Packard Co., USA)。
- (4) 核酸定序儀：美國 Applied Biosystems 公司製，型號 ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer。

- (5) 無菌操作台：台灣安帥工業股份有限公司，型號 4BH-24。
- (6) 電子天秤：美國 A&D 公司製，型號 HR-200。
- (7) 電泳槽：美國 Cosmo Bio 公司製，型號 Mulpid 21。
- (8) 聚合酶鏈鎖反應器：美國 Applied Biosystem 公司製，型號 GeneAMP[®] PCR System 9700。
- (9) 影像擷取設備：購自進階科技股份有限公司，型號 UVP Bioimaging Systems DigiDoc-It-System。
- (10) 變性梯度凝膠電泳設備：美國 Bio-Rad 公司製，型號 D-Code Universal Mutation Detection System。
- (11) pH Meter：英國 Mettler-Toledo 公司製，型號 Delta-350。



(二) 方法

1. 水稻種植方法

種植台梗 9 號水稻 (*Oryza sativa*) 於日溫 30 °C，夜溫 25 °C，相對濕度 75-90% 之人工氣候室 (Pytotron) 中。實驗開始前於 12 盆 1/5000 華格納鉢 (Wagner's pot)，各 3.5 kg 的土壤樣品 (約 15 cm 高) 中各添加基肥 240 kg ha⁻¹ 硫酸銨 ((NH₄)₂SO₄)、200 kg ha⁻¹ 過磷酸鈣 (主要成分為 Ca (H₂PO₄)₂ 及 CaSO₄·2H₂O) 及 120 kg ha⁻¹ 氯化鉀 (KCl) 並與土壤樣品混合拌勻，之後於盆栽中添加灌溉水至其較土表高 3-5 cm 處。

發芽約 15 天的水稻幼苗 (圖 3.3) 於丁基拉草施用後一天由苗床移植到華格納鉢中，每鉢三株，單本植。12 盆土壤樣品分別經過三種濃度之丁基拉草處理：一、不添加丁基拉草之對照組；二、添加推薦用量(1.5 g are⁻¹)丁基拉草處理；及三、添加 10 倍推薦用量(15 g are⁻¹)丁基拉草處理。施用方法為於 10 g 土壤中添加 20 mL 去離子水，並加入相當濃度的丁基拉草，劇烈震盪混合後均勻施用在含有 3.5 kg 土壤樣品的華格納鉢表面。

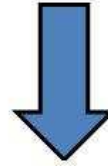
三種丁基拉草濃度處理之土壤樣品分別於下列時間點採集：7、37、67、及 100 天，大約對應於水稻之成活期、孕穗期、開花期及成熟期。土壤樣品採集時分為上層 0-3 cm 及下層 3-15 cm 分別採取，每種處理三重複。水稻種植日期及土壤採樣時間列於表 3.1 中。



15 Days Old Rice Seeding (Tai-ken No. 9)

Adding nitrogen, phosphorous and potassium fertilizer before surface applying the butachlor a day before rice transplanting

Soil Treatment



The Cultivation of Rice in the Phytotron



Transplanting 3 Seedlings in Each Pot

圖 3.3 水稻種植過程

Fig 3.3 The rice planting process

表 3.1 水稻種植及取樣時間日程表

Table 3.1 Dates of rice growth and soil sampling

Days of Rice Growth	Date	Growth Stage	Control point	Notation
1	July 23, 2005	transplanting	keep survival	
7	July 30, 2005	survival stage	reserve plants with uniform size, keep enough space for plants	first sampling
37	Aug. 29, 2005	tillering stage		second sampling
67	Oct. 4, 2005	flowering stage		third sampling
100	Nov. 4, 2005	ripening stage		fourth sampling

2. 固氮活性測定

本研究由乙炔還原量代表固氮活性(Burris, 1975) , 實驗方法並經修改(Charyulu et al., 1981; Nayak et al., 1980; Rao et al., 1983) 。秤取 10 g 土壤樣品於 30 mL 樣品瓶中，之後添加 0.5% 葡萄糖溶液，並攪拌均勻。將上述樣品瓶以矽膠塞密封後，以針筒抽取上部 10% 之空氣，並以乙炔氣體置換之。於 30 °C 下孵育上述樣品 24 小時，之後以 GC-FID (China Chromatography GC9800) 測量乙烯的生成量。GC-FID 之分析條件為注射部溫度 150 °C、管柱溫度 150 °C 及偵測器溫度 200 °C，載行氣體為一般純度氮氣。層析管柱為 SUPEL 毛細管柱，長度 15 ft，內徑 1/8 in。固氮活性以 $\mu\text{moles of C}_2\text{H}_4 \text{ formed g dry soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 表示之。

3. 核酸萃取

將盆栽土壤全部取出並分為上層土壤 0-3 cm 及下層土壤 3-15 cm 兩部分，分別混和均勻後取適量萃取土壤微生物總 DNA。土壤微生物總 DNA 萃取以 UltraClean™ Soil DNA Isolation kit(MO BIO Laboratories, Inc.)從事之，之後並儲存於-20 °C。

4. 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

微生物總 DNA 經萃取後，以聚合酶鏈鎖反應擴增土壤中微生物菌群之 16S rDNA 及 *nifH* 基因片段。所採用的引子如表 3.2 所示。其中，PCR-DGGE 實驗所需的 PCR 引子需使用一段長 40 bps 的 GC-clamp。此段 GC-clamp 被設計加在 Forward primer 的 5'端，目的是為了使 PCR 的產物在接下來 DGGE 的實驗中不會完全變性分離成兩條單股 DNA。PCR 反應的進行主要包含三個步驟：Denaturation、Primer Annealing 以及 Primer Extension。本實驗的反應試劑及條件如表 3.3 及圖 3.4 所示。



表 3.2 本研究中所使用的引子

Table 3.2 Primers in this study

Primers	Specificity	Sequence (5'-->3')	Reference
968f	Bacteria	GC-clamp + AACGCGAAGAACCTTAC	(Erwin et al., 1998)
1401r	Universal	GCGTGTGTACAAGACCC	
nifH F	<i>nifH</i> gene	GC-clamp + AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC	(Rösch et al., 2002)
nifH R	<i>nifH</i> gene	TTGTTSGCSGCRTACATSGCCATCAT	
GC-Clamp	---	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGG CACGGGGGG	(Muyzer et al., 1993)

表 3.3 PCR 反應試劑成分

Table 3.3 The component of PCR reaction buffer

Component	Volume (μL)	Final concentration
10 X PCR reaction buffer	5	1X
50 mM MgCl_2 solution	3	3 mM
20 mM dNTP mixture	2	0.2 mM for each dNTP
Primers (Forward and Reverse)	X (f + r)	0.4 μM for each
DNA template	1	100 – 200 ng
Taq DNA polymerase ($5\text{U } \mu\text{L}^{-1}$)	0.5	2.5 unit
Autoclaved distilled water	38.5 - X	---
Final volume	50	---

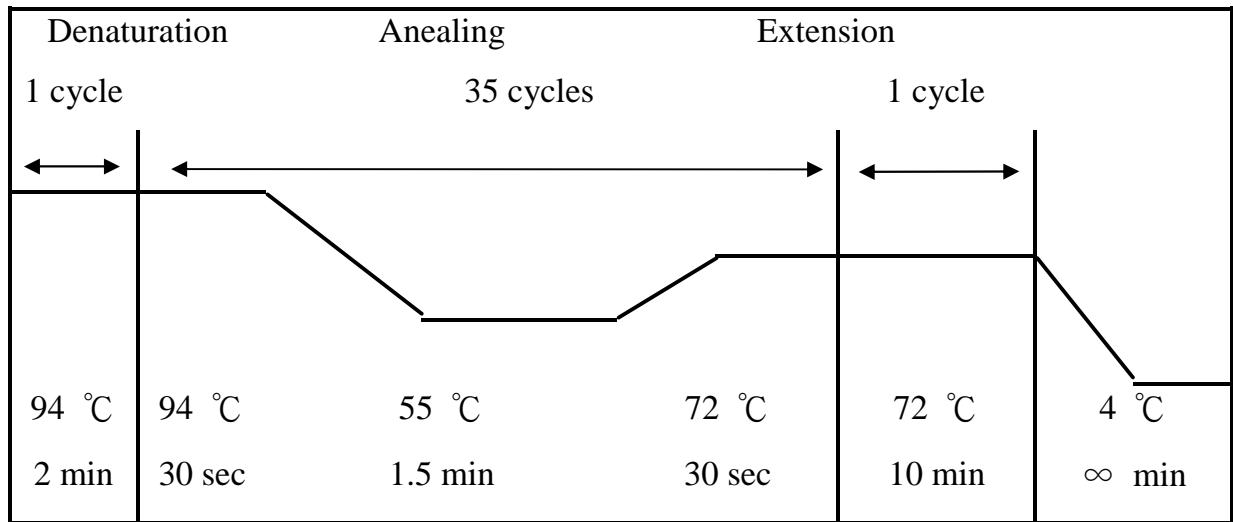
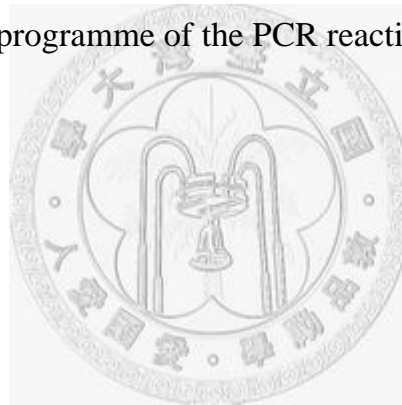


圖 3.4 PCR 反應溫度控制圖

Fig 3.4 The temperatur programme of the PCR reaction



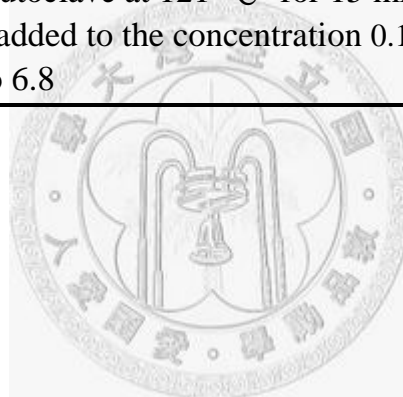
5. DGGE 圖譜之標準分子尺置備

為一、比較不同批次的 DGGE 圖譜，及二、同一 DGGE 圖譜梯度的對應上的需要，吾人置備一標準分子尺，以作為比較的指標。此步驟自水田土壤中分離至少五種以上的菌種，經培養後抽取其 DNA，並經 PCR 擴增其 16S rDNA 基因片段，之後於 DGGE 時混合置於同一 Well 中。首先取 1 g 水田土壤置入 9 mL 之無菌水中，連續稀釋後取 100 μ L 菌液均勻塗抹於無氮平面培養基（Nitrogen-free Biotin-based Medium，簡稱 NFB）上，培養基成分如表 3.4 所示（Haahtela et al., 1981）。將培養基置於 30 $^{\circ}$ C 下培養數日，之後挑取型態相異的單一菌落置於 NFB 液體培養基中放大其菌數，並以 UltraCleanTM Soil DNA Isolation kit（MO BIO Laboratories, Inc.）萃取該微生物的總 DNA。之後以核酸定序儀（ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer, Perkin Elmer Applied Biosystems, Wellesley, MA, USA）偵測個別微生物的 DNA 序列。所得序列以 BLAST 程式（[Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)）比對其菌屬名。

表 3.4 本研究所使用之 NFB 無氮培養基成分表 (Haahtela et al., 1981)

Table 3.4 The component of nitrogen-free biotin-based medium, NFB

Component	1000 mL
Malic acid	5.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
CaCl ₂	0.02 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.002 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0.01 g
Fe-EDTA (1.64 % w/v aqueous)	4.0 mL
Bromothymol blue (0.5% w/v in ethanol)	3.0 mL
KOH	4.5 g
Agar	15 g
——> Sterilize in autoclave at 121 °C for 15 min	
——> Biotin were added to the concentration 0.1 mg/L	
——> Adjust pH to 6.8	



6. 變性梯度凝膠電泳 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

變性梯度凝膠電泳 (DGGE) 在本研究中用來偵測丁基拉草施用下土壤固氮菌菌相及真細菌菌相的變異。取 25 μL 經 PCR 擴增後的微生物 DNA，注入大小 10 \times 16 cm 含 7% Acrylamide/Bis 的變性凝膠 (表 3.5) 中 (變性梯度為 40% – 60%)，於固定電壓 70 V、60 $^{\circ}\text{C}$ 下，在含 7 L TAE 緩衝液的電泳槽中進行電泳 12 小時。電泳後，膠片的染色方式為將膠片浸泡在含 SYBR[®] Green I 的染劑槽中，以手晃動 5 分鐘，再靜置半小時以後，直接於 UV 光下以數位相機拍下結果。DGGE 所需試劑如表 3.6-3.8 所示。



表 3.5 不同濃度之 Acrylamide/Bis 所能分離之核酸長度

Table 3.5 The percentage of Arylamide/Bis needed for a particular size range

Gel percentage	Base pair separation
6%	300 – 1000 bp
8%	200 – 400 bp
10%	100 – 300 bp

表 3.6 7% 之 Acrylamide/Bis 變性凝膠成分

Table 3.6 The component of 7% Acylamide/Bis

	40% Denaturing solution	60% Denaturing solution
40% Acrylamide/Bis	17.5 mL	17.5 mL
50x TAE buffer	2 mL	2 mL
Formamide (Deionized)	16 mL	24 mL
Urea	16.8 g	25.2 g
dH ₂ O	To 100 mL	To 100 mL

Degas for 10 – 15 minutes. Filter through a 0.45 μ filter. Store at 4 °C in a brown bottle for less then a month. A 100% denaturing solution requires re-dissolving after storage. Place the bottle in a warm bath stir for faster results.

表 3.7 10% Ammonium persulfate 之成分

Table 3.7 The component of 10% Ammonium persulfate

Reagent	Amount
Ammonium persulfate	0.1 g
dH ₂ O	1.0 mL

Store at -20 °C for less then a week.

表 3.8 DCode 染劑之成分

Table 3.8 The component of DCode dye solution

Reagent	Amount	Final concentration
Bromophenol blue	0.05 g	0.5%
Xylene cyanol	0.05 g	0.5%
1X TAE buffer	10.0 mL	1X

Store at room temperature. This reagent is supplied in the DCode electrophoresis reagent kit for DGGE, CDGE.



7. 如何使用本研究相關之統計分析軟體

本研究主要使用 Quantity One[®] 分析軟體 (Bio-Rad, USA) 從事 DGGE 圖譜的亮帶辨認與相似矩陣的計算。市面上可用來從事相關的分析軟體還有許多, GelCompar (Applied Maths, Ghent, Belgium) 便是一例。使用 Quantity One[®] 前需在 Bio-Rad 網站上登記註冊, 方能下載該軟體的試用版本及使用手冊。該辨識分析軟體應用在 DGGE 圖譜的分析上, 主要包含以下幾個部分 (以 Quantity One[®] 分析軟體為例):

(1) 影像取得與最佳化

包含 A. 影像的輸入與格式轉換: 影像輸入時需要特定的檔案輸入格式 (如 Tiff 檔), 此外, 如果電泳圖譜的背景訊號強度比亮帶大, 則需要將影像反轉 (Invert); 及 B. 電泳膠體背景雜訊或攝影時所產生的背景干擾的辨認與去除。

(2) Lane 及亮帶 (Band) 辨識與分析

包含 A. 正確地標示圖譜上的各 Lane 的中心位置, 及以軟體去除各 Lane 背景值; B. 正確地辨認亮帶的位置。有時候電泳圖譜並非呈現均一的染色結果, 而產生部分影像背景與亮帶較為相近, 使軟體直接辨識的情況, 此時則需要手動加入亮帶; 及 C. 比較各 Lane 的差異。此步驟須預先定義一標準尺, 其他各 Lane 再與標準尺作比較, 以得到各亮帶之相對位置或亮度差異等資料。

(3) 統計分析

這部分包含相當多的統計工具選擇, 與本研究相關的包含 A. 各 Lane 的相似矩陣 (Similarity Matrix) 及距離矩陣 (Distance Matrix) 的計算, 及 B. 樹狀圖的計算與形象化 (Visualization), 此部分將於下一小節專門說明。

由以上介紹可知, DGGE 圖譜的辨識與結果分析因操作者的設定而存在相當大差異的可能, 不同的操作變因會影響研究者對實驗結果的解讀, 因此

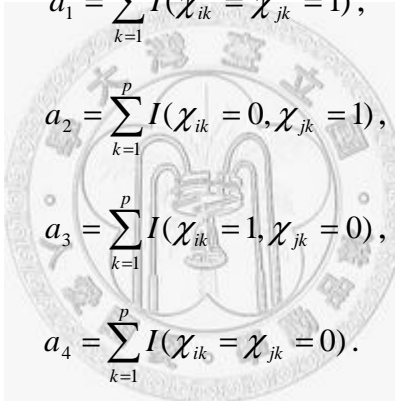
使用者應小心從事以得到最接近事實的結果。

8. DGGE 圖譜的統計分析

本研究中，DGGE 圖譜的辨認與分析以 Quantity One[®] 軟體 (Bio-rad, USA) 從事之。同一圖譜上各 Lane 的相似度以 Dice 參數 (1945) 計算，其公式如下：

$$\frac{2a_1}{2a_1 + (a_2 + a_3)}$$

其中，


$$\begin{aligned} a_1 &= \sum_{k=1}^p I(\chi_{ik} = \chi_{jk} = 1), \\ a_2 &= \sum_{k=1}^p I(\chi_{ik} = 0, \chi_{jk} = 1), \\ a_3 &= \sum_{k=1}^p I(\chi_{ik} = 1, \chi_{jk} = 0), \\ a_4 &= \sum_{k=1}^p I(\chi_{ik} = \chi_{jk} = 0). \end{aligned}$$

$a_l, l = 1, \dots, 4$, 取決於數對 (χ_i, χ_j) 的結果 (Härdle and Simar, 2003)。

親源關係樹的產生以 UPMGA 法計算之。為決定該樹狀圖的群集數目，首先以 Statistica 6.0 將相似度矩陣轉換為歐基里德矩陣 (Euclidean Distance Matrix)，之後計算若群集數目為 1-11 時，各矩陣之 MD 數值。

MD 的求法如下：

假設有兩族群 A 與族群 B，其距離為

$$\min\{d(x, y) : x \in A, y \in B\}$$

以 MD 參數對分群數目作圖，並以其轉折點 (Turning Point) 處的分群數目作為 UPGMA 圖譜分群的參考。因統計上並無對轉折點的嚴格定義，因

此，在本論文中，對轉折點的定義為，當 MD 參數值產生急遽的變化時，該點即為轉折點。然而，當一圖中有多個轉折點時，需參考實驗的條件與水稻生長期以使分群結果符合實驗上的意義。

9. 可培養性之細菌與游離固氮菌群的計數、分離與鑑定

為進一步分析固氮菌群受丁基拉草施用的影響，本研究於平面 NFB 無氮培養基上分離丁基拉草施用第 7 天與第 39 天時，控制組與 10 倍推薦用量 (15 g are^{-1}) 丁基拉草處理下表觀型態相異的菌落，並以 NFB 培養基加以震盪增殖（實驗方法及步驟同材料與方法 5）。以 UltraClean™ Soil DNA Isolation kit (MO BIO Laboratories, Inc.) 萃取該微生物的 DNA，之後以核酸定序儀 (ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer, Perkin Elmer Applied Biosystems, Wellesley, MA, USA) 偵測該微生物的 DNA 序列。所得序列以 BLAST-N 程式 ([Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) 比對確認其菌屬名。細菌之分離與鑑定方式與游離固氮菌相似，但其培養基使用營養培養基 (Nutrient Broth)，培養基成分如表 3.9 所示。

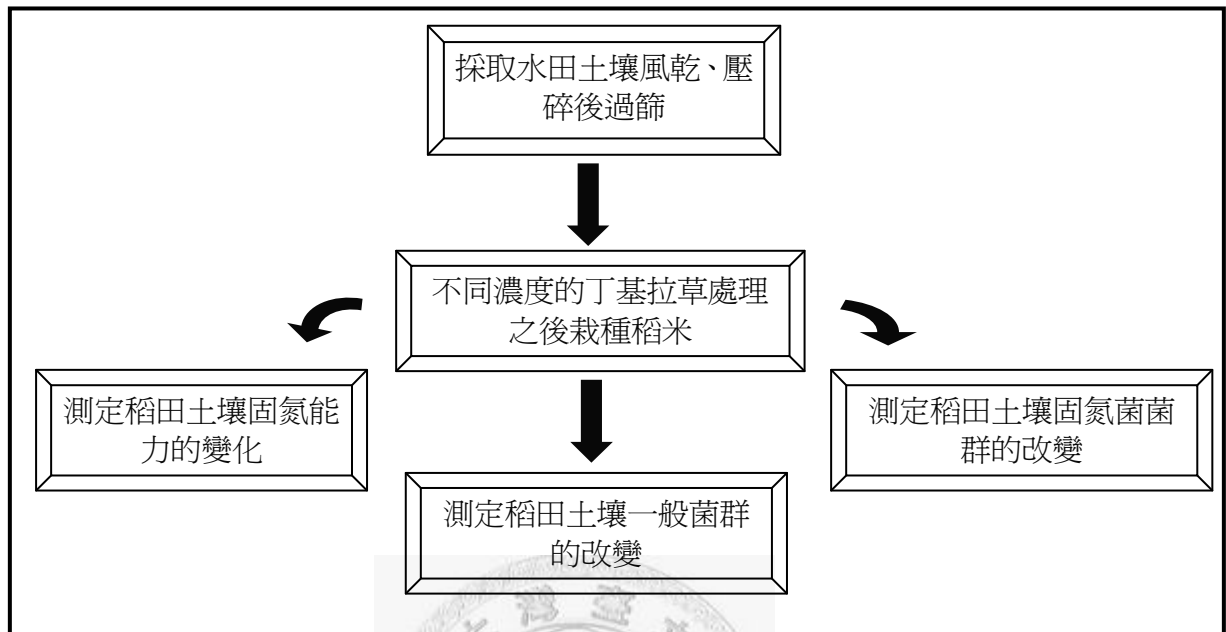
表 3.9 本研究所使用之營養培養基 (NB) 成分表 (每升)

Table 3.9 The component of nutrient broth (NB) medium (per liter)

Component	Amount
Beef extract	3.0 g
Peptone	5.0 g



10. 本論文之實驗流程



四、結果與討論

(一) 丁基拉草施用下土壤固氮活性的改變

本研究中，為瞭解不同濃度丁基拉草施用下，土壤固氮活性的變化情形，分別添加不同濃度的丁基拉草於種植水稻的盆栽中，並於不同水稻生長期採取土壤樣品測量其乙炔還原反應的改變，以量度土壤固氮活性的變化情形。

表 4.1 及 4.2 為丁基拉草施用濃度為 0、1.5 g are⁻¹ 及 15 g are⁻¹ 時上層及下層土壤（分別為深度 0-3 cm 及 3-15 cm）於水稻成活、分蘗、開花及成熟期（分別為水稻移植後第 7、第 37、第 67 及第 100 天）的乙炔還原反應變化情形。

由表 4.1 可知，於水稻移植後第 7 天時，施用 1.5 g are⁻¹ 丁基拉草處理使上層土壤的乙炔還原反應較控制組減低 13.0%；但在第 37 天時則使反應增加 4.60%。除水稻成活期外，低濃度的丁基拉草施用對於土壤乙炔還原反應並無顯著的影響。

於水稻移植後第 7 天時，施用 15 g are⁻¹ 丁基拉草處理使上層土壤的乙炔還原反應較控制組減低 12.6%；但在第 37 天時則使反應增加 23.3%。在水稻開花期（第 67 天）時，高濃度的丁基拉草施用並無顯著影響，然而在成熟期（第 100 天）時乙炔還原反應則有顯著的上升（+7.21%）。這個現象顯示上層土壤的游離固氮菌族群可能因丁基拉草的施用而造成菌相長久的變異，並且，也使得土壤固氮作用上升。

表 4.1 中，以鄧肯氏多變域測驗（ $\alpha=0.05$ ）分析不同丁基拉草濃度（顯示欄的變異，以小寫字母表示）及不同水稻生長期（顯示列的變異，以大寫字母表示）所造成的乙炔還原反應變化的顯著性。由表可知，水稻成活期時，於上層土壤中，兩種濃度的丁基拉草施用皆能顯著的提高土壤的固氮活性。

但在水稻成熟期時，只有高濃度的丁基拉草施用可以提升土壤的固氮活性。但這也可能是丁基拉草施用與水稻生長時期土壤狀態的變化所綜合造成的差異；因於相同的丁基拉草施用量下，開花期與成熟期的乙炔還原反應亦可能具有顯著的差異。

由表 4.2 可知，於水稻移植後第 7 天時，施用 1.5 g are^{-1} 丁基拉草處理使下層土壤的乙炔還原反應較控制組減低 7.6%；但自第 37 天開始則分別使反應增加 3.95%、1.66% 及 0.972%。但除了在水稻開花期時，低濃度的丁基拉草施用對於土壤乙炔還原反應並無顯著的影響。

於水稻移植後第 7 天時，施用 15 g are^{-1} 丁基拉草處理使下層土壤的乙炔還原反應較控制組減低 7.5%；但自第 37 天開始則分別使反應增加 41.0%、1.36% 及 3.36%。這個現象顯示下層土壤的游離固氮菌族群可能因丁基拉草的施用而造成菌相長久的變異，並且，於水稻全生長期時皆使得土壤固氮作用上升。

表 4.2 中，以鄧肯氏多變域測驗 ($\alpha=0.05$) 分析不同丁基拉草濃度（顯示欄的變異，以小寫字母表示）及不同水稻生長期（顯示列的變異，以大寫字母表示）所造成的乙炔還原反應變化的顯著性。由表可知，於下層土壤中，兩種濃度的丁基拉草施用皆能顯著的提高土壤的固氮活性，並且於水稻成熟期時，高濃度的丁基拉草施用較低濃度丁基拉草施用更能顯著地促進土壤固氮作用。

由張（2001）的研究得知，在 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的砂質壤土孵育實驗中，丁基拉草的半衰期為 16 天。然而，於本實驗 100 天的水稻生長期中，與控制組相較，施用丁基拉草均可能使增進或抑制土壤固氮作用。顯示土壤施用除草劑丁基拉草可能造成土壤固氮菌相長期的改變。

由實驗結果可知，丁基拉草的施用可提升土壤固氮作用，此現象於水稻分蘗時期最為顯著。而在 Suseela（2001）的研究結果中指出，丁基拉草的施用可以增進藍綠菌 *Anabaena sphaerica* 的生質量及固氮作用。Das 及 Debnath 於 2006 年的研究中亦指出，施用 $2.9 \text{ kg a.i. ha}^{-1}$ 的丁基拉草可提升

31.6% 游離固氮菌族群的數目，且可提升土壤固氮活性達 10%。因此，吾人認為稻田土壤固氮作用的提升可能導因於游離固氮菌總體生質量的提升，或者是游離固氮菌相組成的改變，此部分將於本研究的下一部份詳細說明。

綜上所述，丁基拉草施用可以改變土壤固氮活性，並且，可能為長期的改變。



表 4.1 不同濃度丁基拉草處理下，上層土壤（0-3 cm）於不同水稻生長期的乙炔還原反應變化

Table 4.1 Acetylene reduction of upper layer soils (0-3 cm) treated with different butachlor concentrations of different rice plant growth stages.

Growing stages	Transplanting	Tillering	Flowering	Ripening
Sampling day	Day-7	Day-37	Day-67	Day-100
Butachlor treated	Ethylene production, $\mu\text{mols (g dry soil)}^{-1}$			
0, Control	5.549 \pm 0.049 aB	6.640 \pm 0.382 bA	4.527 \pm 0.065 aC	4.517 \pm 0.118 bC
1.5 g are ⁻¹	4.826 \pm 0.072 bB (-13.02%)	6.945 \pm 0.133 bA (+4.593%)	4.550 \pm 0.019 aC (+0.5080%)	4.433 \pm 0.143 bC (-1.860%)
15 g are ⁻¹	4.850 \pm 0.331 bB (-12.60%)	8.184 \pm 0.098 aA (+23.25%)	4.503 \pm 0.029 aC (-0.5301%)	4.843 \pm 0.079 aB (+7.217%)

Statistically significant differences shown by Duncan's multiple range test ($\alpha=0.05$); similar small letters within same columns are not significantly differences among butachlor concentrations treated and similar capital letters within same rows are not significantly differences among growing stages of rice plant. Differences of ethylene products compared to control show in parenthesis.

表 4.2 不同濃度丁基拉草處理下，下層土壤（3-15 cm）於不同水稻生長期的乙炔還原反應變化

Table 4.2 Acetylene reduction of lower layer soils (3-15 cm) treated with different butachlor concentrations of different rice plant growth stages.

Growing stages	Transplanting	Tillering	Flowering	Ripening
Sampling day	Day-7	Day-37	Day-67	Day-100
Butachlor treated	Ethylene production, $\mu\text{mols (g dry soil)}^{-1}$			
0, Control	4.586 \pm 0.085 aB	6.606 \pm 0.499 bA	4.406 \pm 0.027 bB	4.320 \pm 0.010 bB
1.5 g are ⁻¹	4.236 \pm 0.004 aC (-7.632%)	6.345 \pm 0.184 bA (+3.950%)	4.479 \pm 0.010 aB (+1.657%)	4.362 \pm 0.051 bBC (+0.9722%)
15 g are ⁻¹	4.241 \pm 0.026 aB (-7.523%)	9.315 \pm 0.564 aA (+41.01%)	4.466 \pm 0.010 aB (+1.362%)	4.465 \pm 0.070 aB (+3.356%)

Statistically significant differences shown by Duncan's multiple range test ($\alpha=0.05$); similar small letters within same columns are not significantly differences among butachlor concentrations treated and similar capital letters within same rows are not significantly differences among growing stages of rice plant. Differences of ethylene products compared to control show in parenthesis.

(二) 丁基拉草施用下土壤游離固氮菌相的改變 (非培養法)

本節以 *nifH* 基因片段之 PCR-DGGE 圖譜探討土壤固氮菌相的改變，圖 4.1 為本研究中 PCR-DGGE 圖譜之標準分子尺。圖 4.2-4.6 為各菌株之核酸定序儀所得的電泳圖譜，由各圖譜的結果可得知各菌株經 PCR 擴增其 16S rDNA 的基因片段的序列，之後再經 BLAST-N 比對其序列，即可推測該序列所代表的菌種。結果分別為 *Microbacterium* sp.、*Arthrobacter* sp.、*Paenibacillus borealis*、*Rhodococcus erythropolis* 及一目前無法由 BLAST-N 比對得知的菌株。

為正確且大量地複製土壤中的 DNA 片段，實驗中嘗試以不同 PCR 條件設定下擴增土壤 DNA 16S rDNA 及 *nifH* 基因片段。如圖 4.7 為不同鎂離子濃度下，進行 PCR 反應擴增土壤 DNA 之 16S rDNA，並以 1% agarose 電泳分析之結果。由結果可知，當鎂離子濃度為 2-3 mM 時，PCR 產物的亮帶濃度較高，並可以準確地複製混合菌 16S rDNA 及 *nifH* 基因片段。

為了瞭解丁基拉草於水稻種植期間對土壤固氮菌菌相的改變情形，本研究以 PCR-DGGE 分析土壤固氮菌菌相的改變。

圖 4.8-4.9 (A) 為水稻成活、分蘗、開花及成熟期（分別為水稻移植後第 7、第 37、第 67 及第 100 天）的 PCR-DGGE 圖譜，而圖 4.8-4.9 (B) 則為該圖譜之 UPGMA 樹狀圖。不同丁基拉草的施用濃度以字母代碼 C、B 及 H 表示。字母 C 為 Control；字母 B 為施用量 1.5 g are^{-1} ；字母 H 則為施用量 15 g are^{-1} 。

由圖 4.8 可知，施用丁基拉草所造成上層土壤固氮菌相的歧異度在水稻移植後第 7 天時為 33%；第 37 天及第 67 天時為 49%；第 100 天時為 64%。觀察 DGGE 圖譜上主要亮帶變化可知，O1 為第 37 天與第 67 天時於控制組中均有出現的亮帶；P1 為第 7 至第 67 天所有處理均出現的亮帶，但於第 100 天時消失；P2-P4 為第 7 天至第 100 天所有處理下均出現的亮帶；N1-N6 為

兩種濃度丁基拉草處理下均出現的亮帶，因此可能為上一節結果中使土壤固氮作用提升的菌群。

由圖 4.9 可知，施用丁基拉草所造成下層土壤固氮菌相的歧異度在水稻移植後第 7 天時為 53%；第 37 天時為 54%；第 67 天時及第 100 天時為 59%。觀察 DGGE 圖譜上主要亮帶變化可知，O1 為第 100 天時於控制組處理下出現的亮帶；P1-P3 為第 7 至第 100 天所有處理均出現的亮帶；N1-N2 為第 100 天時兩種濃度丁基拉草處理下均出現的亮帶，因此可能為上一節結果中使土壤固氮作用提升的菌群。

上述研究結果顯示，水稻種植期間與丁基拉草的綜合效應可造成表土及裏土中土壤固氮菌相的改變，尤其水稻存活期時，以裏土中之固氮菌相受其改變較巨。但長期而言，不論是表土或裏土之游離固氮菌相均維持 50% 以上的變異。對應於土壤固氮活性的變化情形，顯示土壤中的固氮菌相變異可能一、傾向於固氮活性較高者生存或二、可能不利於其他菌種生存。此部分推論需其他實驗結果佐證，因此於本研究結果與討論中第五及第六部分討論之。參考主要亮帶存在的位置可知，丁基拉草處理下，可能利於某些 DNA 中 G+C 含量較高游離固氮菌群存活及作用。此外，由於本研究宗旨在探討丁基拉草施用於稻田土壤對微生物生態的改變，因此採用統計參數 MD 進一步確定各 UPGMA 圖譜分群數目，如果可以成功地將控制組與處理組分於不同群組，即可進一步確認丁基拉草的施用的確對土壤微生物生態造成改變，這部分研究結果將於第四部分探討。

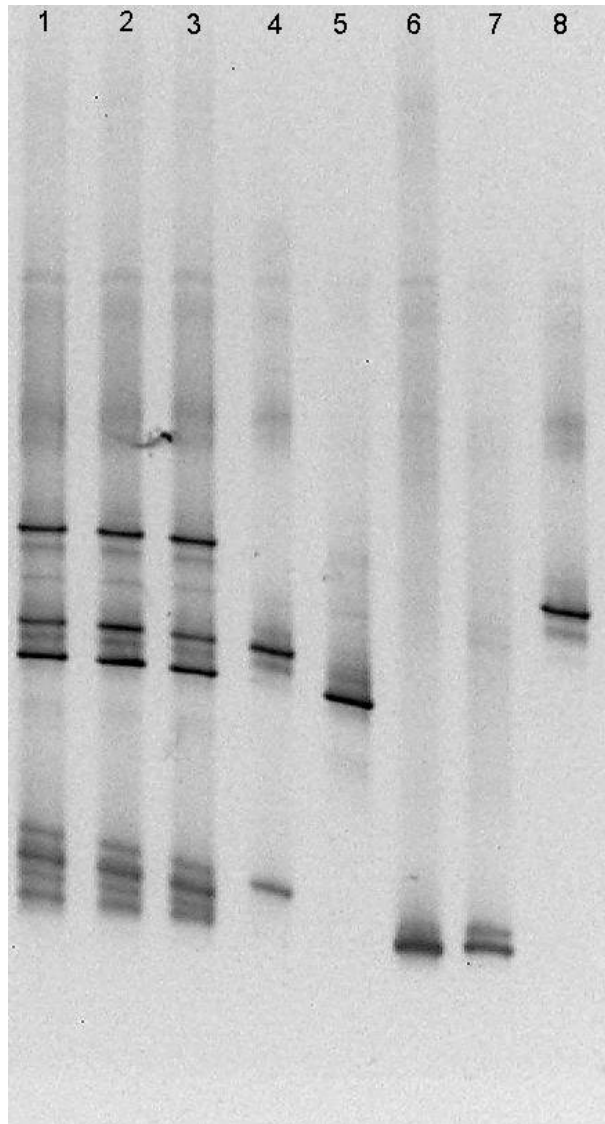


圖 4.1 本研究中 PCR-DGGE 圖譜之標準分子尺。

Fig 4.1 The standard molecular ruler in PCR-DGGE dendrograms.

Lane 1-3: mixture of marker DNAs

Lane 4 : *Microbacterium* sp.

Lane 5 : *Arthrobacter* sp.

Lane 6 : *Paenibacillus borealis*

Lane 7 : *Rhodococcus erythropolis*

Lane 8 : Unidentified

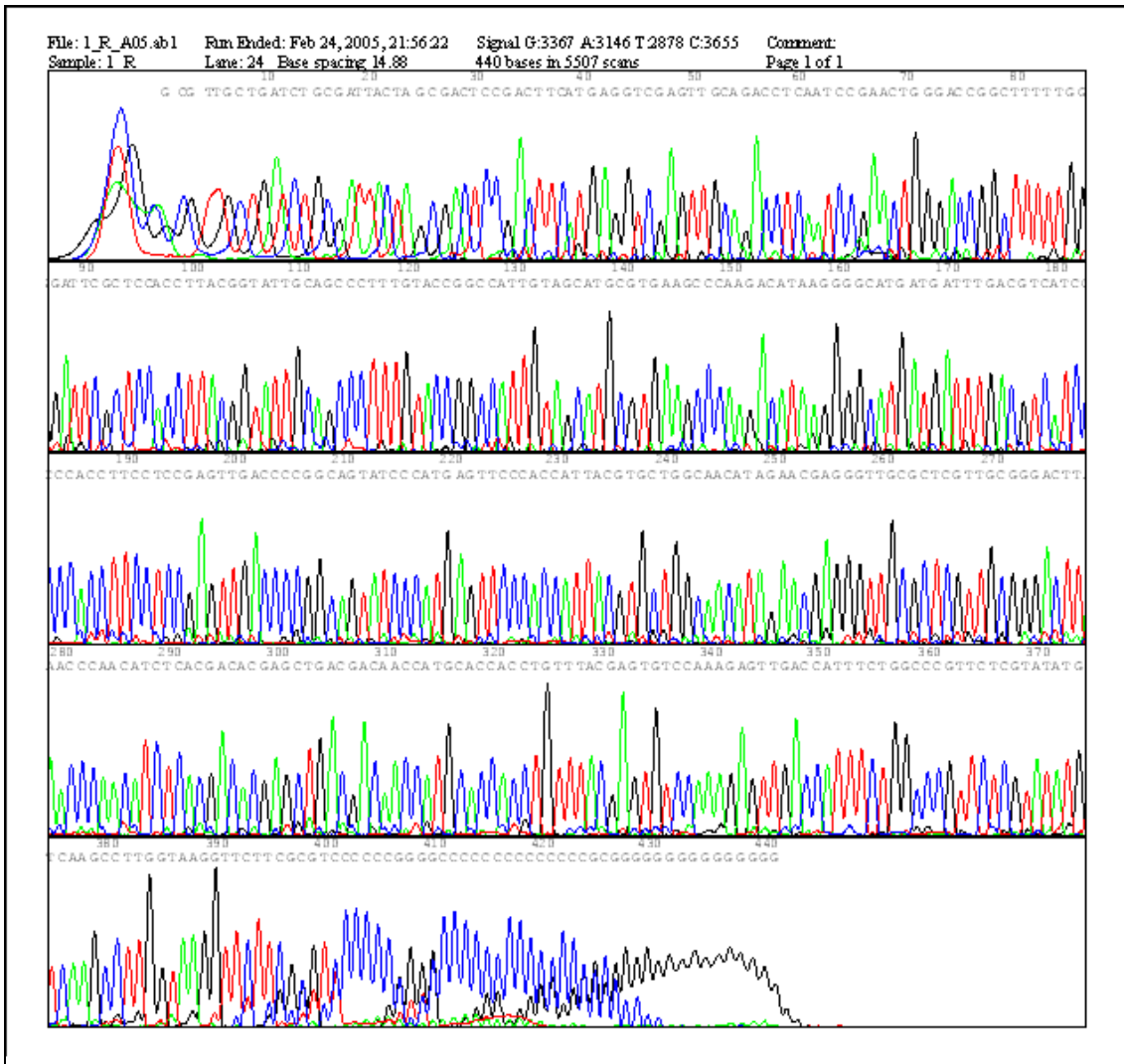


圖 4.2 *Microbacterium* sp. 之核酸定序電泳結果。

Fig 4.2 The result of *Microbacterium* sp. sequence analysis.

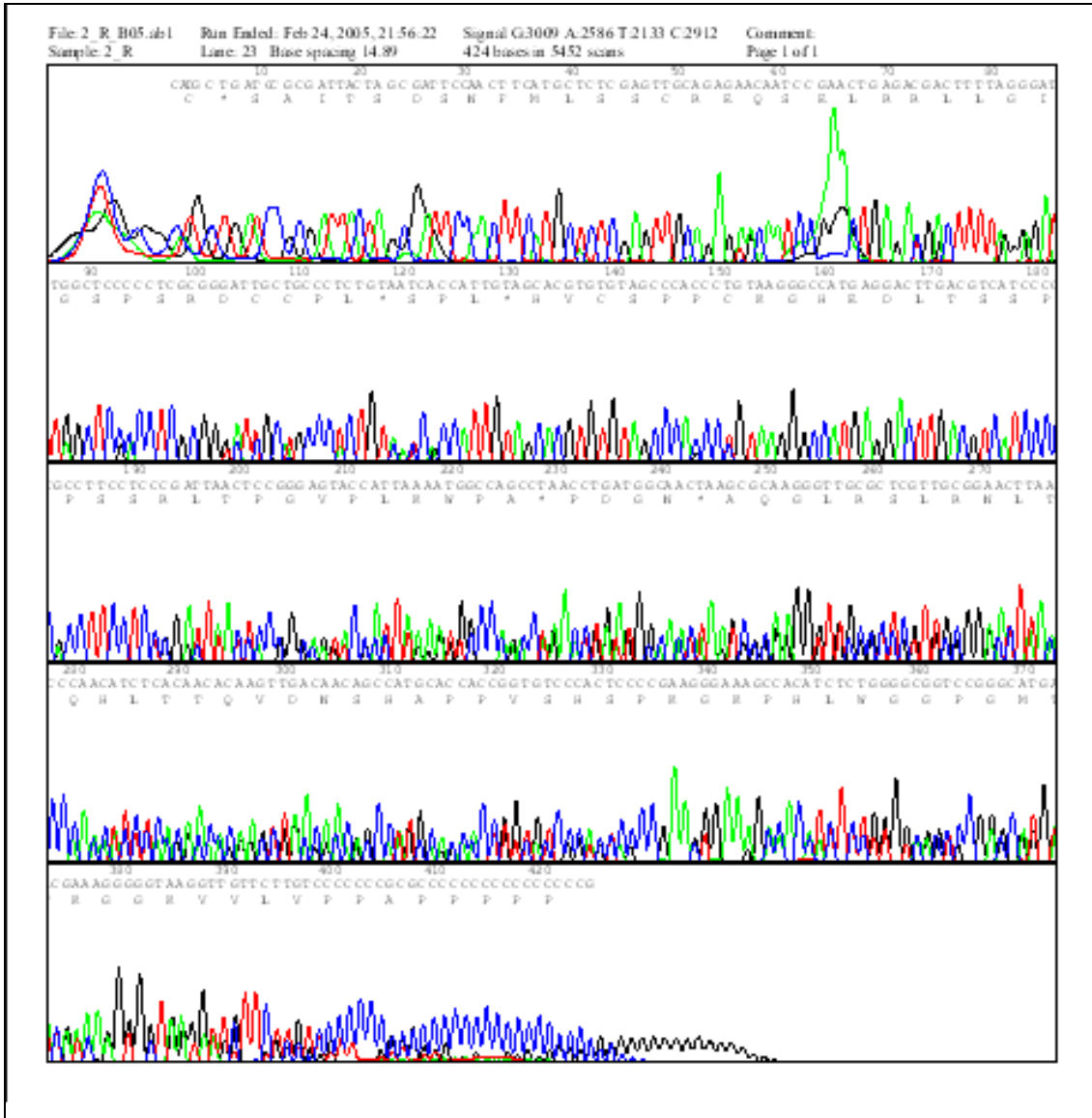


圖 4.3 *Arthrobacter* sp. 之核酸定序電泳結果。

Fig 4.3 The result of *Arthrobacter* sp. sequence analysis.

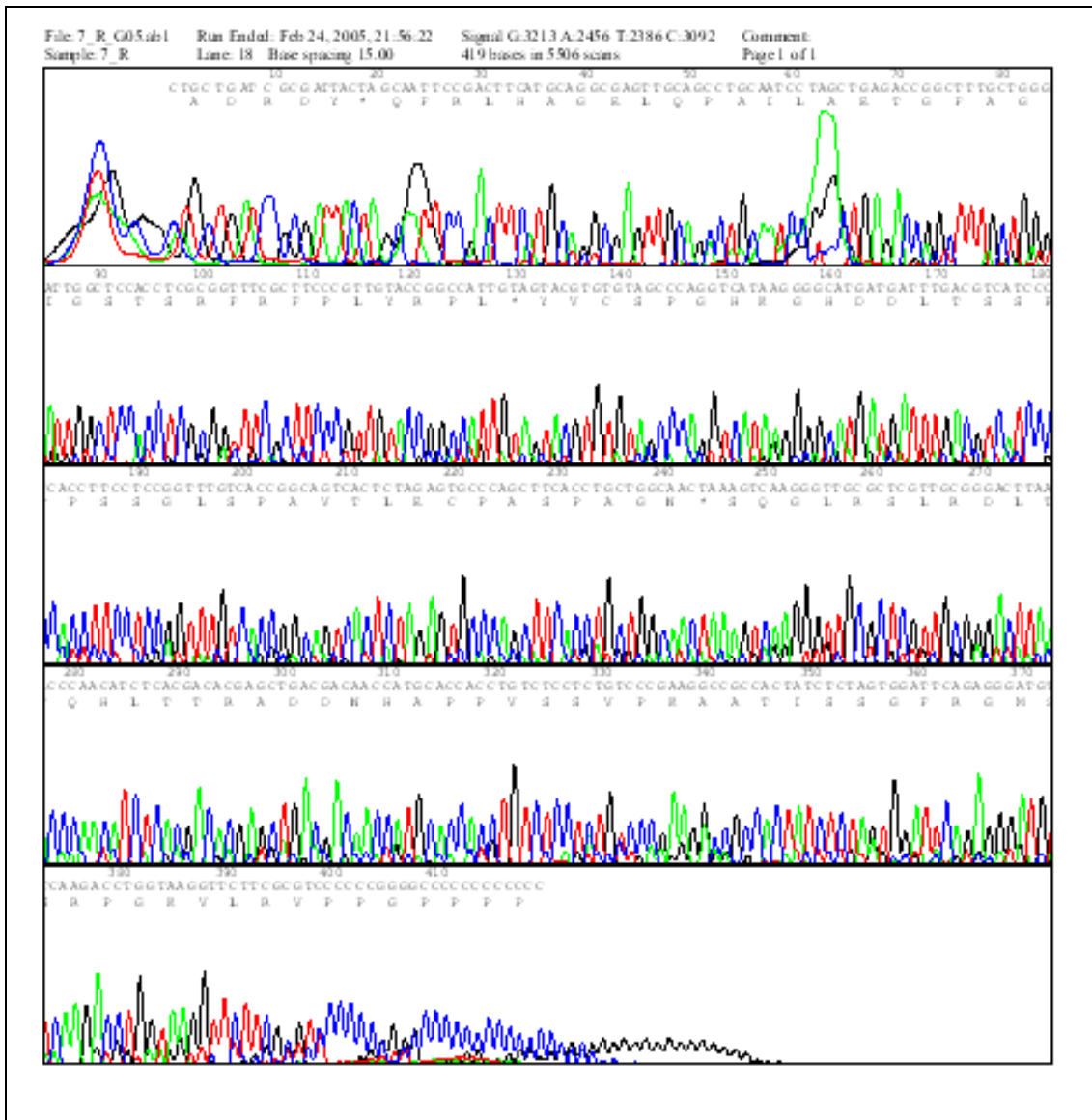


圖 4.4 *Paenibacillus borealis* 之核酸定序電泳結果。

Fig 4.4 The result of *Paenibacillus borealis* sequence analysis.

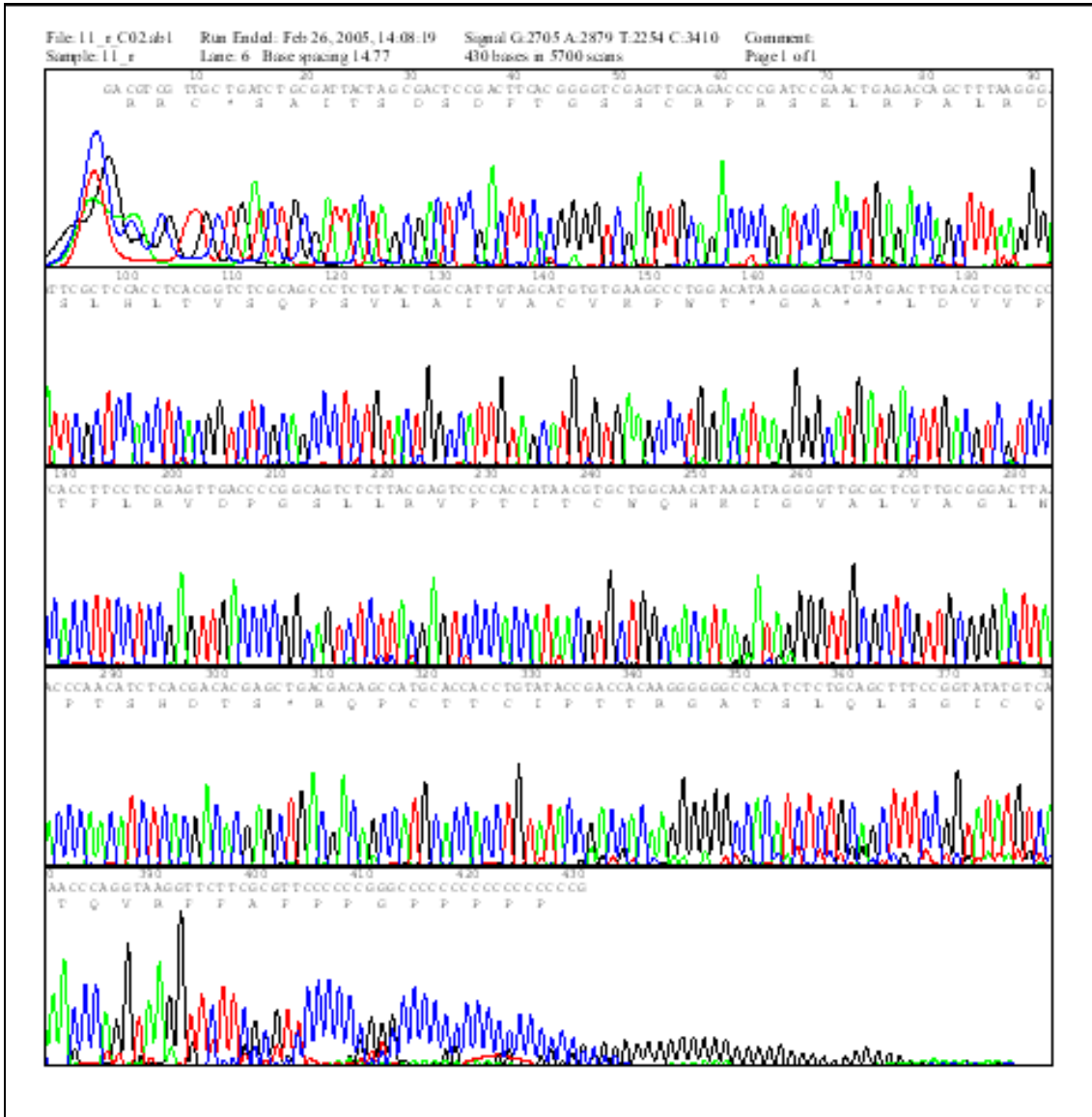


圖 4.5 *Rhodococcus erythropolis* 之核酸定序電泳結果。

Fig 4.5 The result of *Rhodococcus erythropolis* sequence analysis.

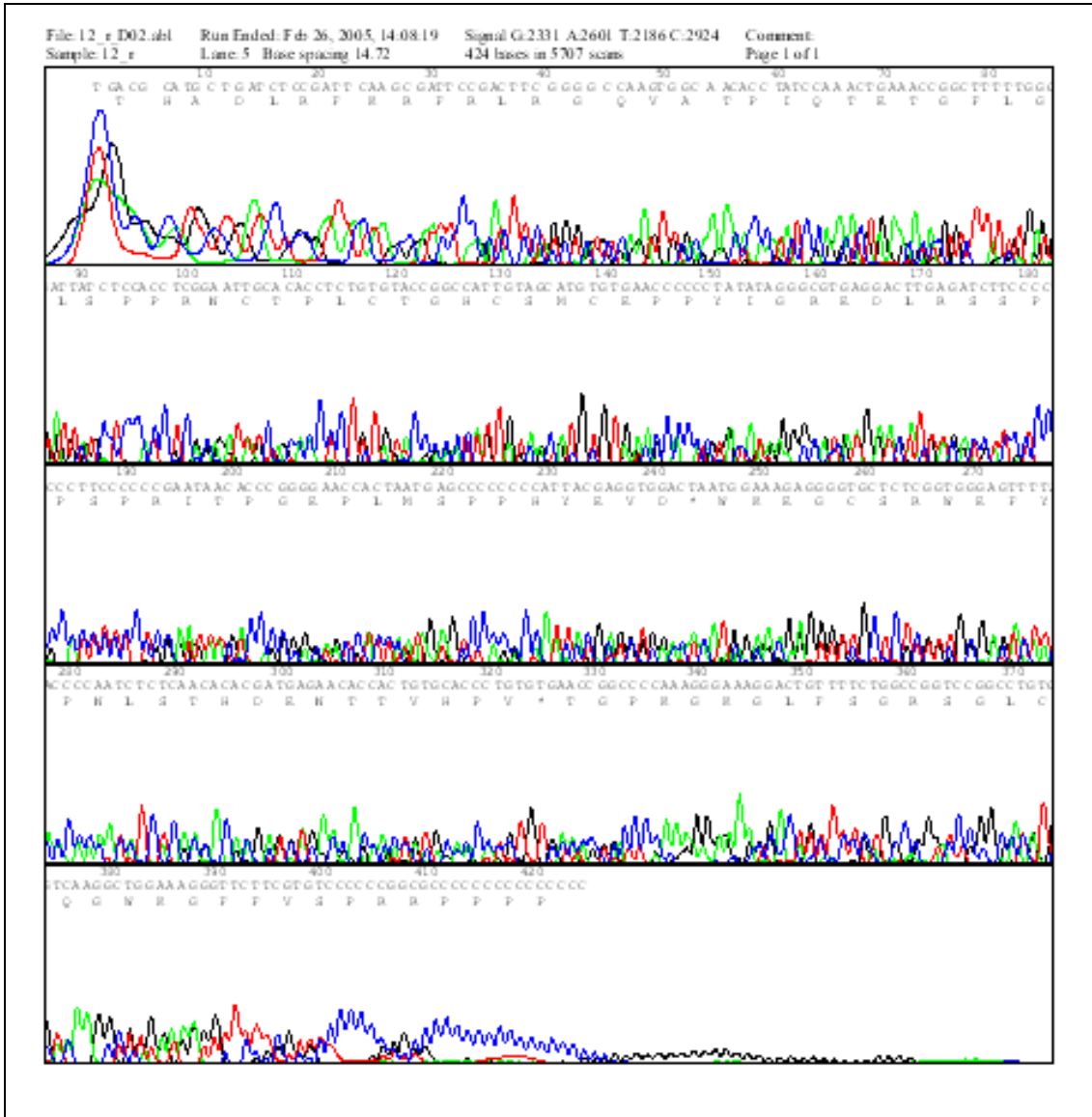


圖 4.6 Unidentified 菌株之核酸定序電泳結果。

Fig 4.6 The result of an unidentified microbial sequence analysis.



圖 4.7 於不同鎂離子濃度下，進行 PCR 反應擴增土壤 DNA 之 16S rDNA 片段後，以 1% agarose 電泳分析之結果。

Fig 4.7 Electrophoresis analysis of PCR-amplified 16S rDNA fragments obtained from soil DNA under different Mg^{2+} concentrations.

Lane 1 : marker

Lane 2 : 1 mM Magnesium ion

Lane 3 : 1.5 mM Magnesium ion

Lane 4 : 2 mM Magnesium ion

Lane 5 : 2.5 mM Magnesium ion

Lane 6 : 3 mM Magnesium ion

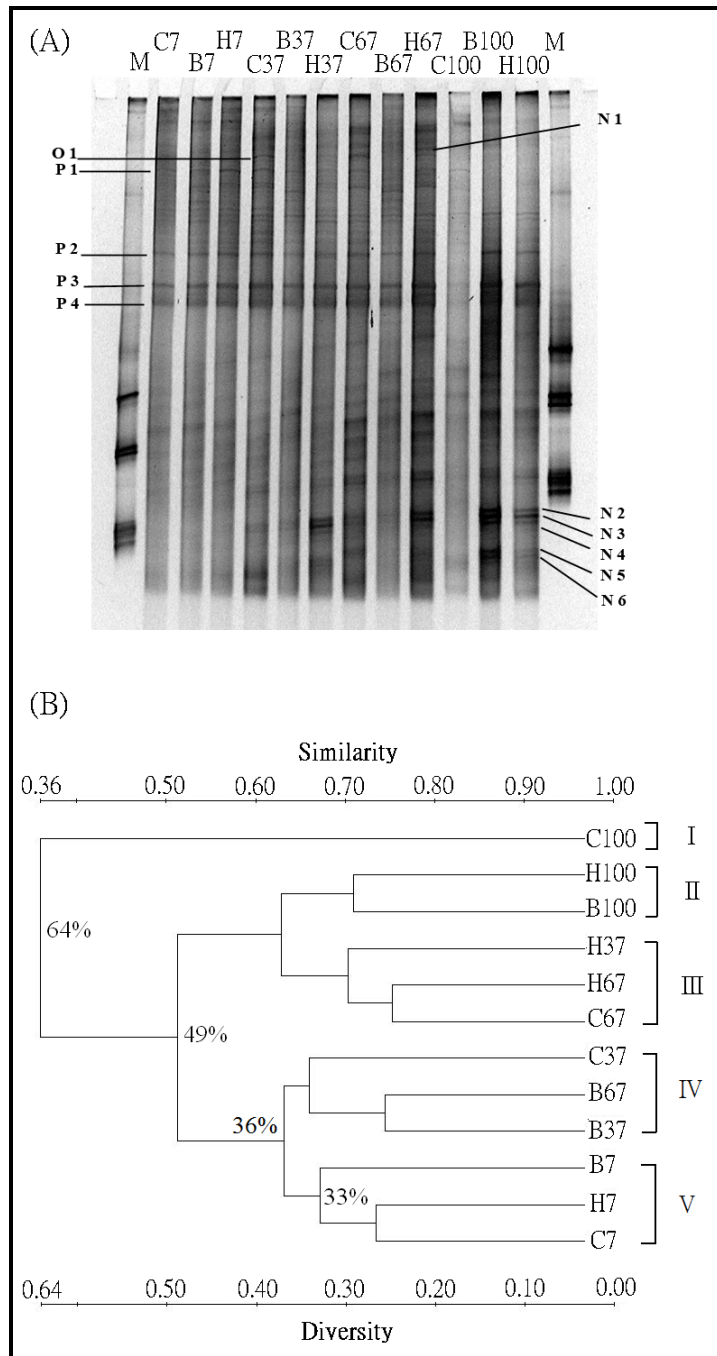


圖 4.8 不同濃度丁基拉草處理下，第 7、37、67 及 100 天上層稻田土壤中之 *nifH* 基因片段的 (A) PCR-DGGE 圖譜及 (B) UPGMA 樹狀圖。代碼字母 M：Marker；C：Control；B：1.5 g are⁻¹ 丁基拉草施用；H：15 g are⁻¹ 丁基拉草施用。(轉下頁)

(Cont.)

Fig 4.8 PCR-DGGE profile and the phylogenetic dendrogram of *nifH* gene fragments in upper layer soils under different concentrations of butachlor after 7, 37, 67, and 100 days of rice growth. Capital letters ahead of the figure are: M, marker; C, control or 0 g are⁻¹ of butachlor; B, 1.5 g are⁻¹ of butachlor; H, 15 g are⁻¹ of butachlor. Figures are the days of rice plant growth.



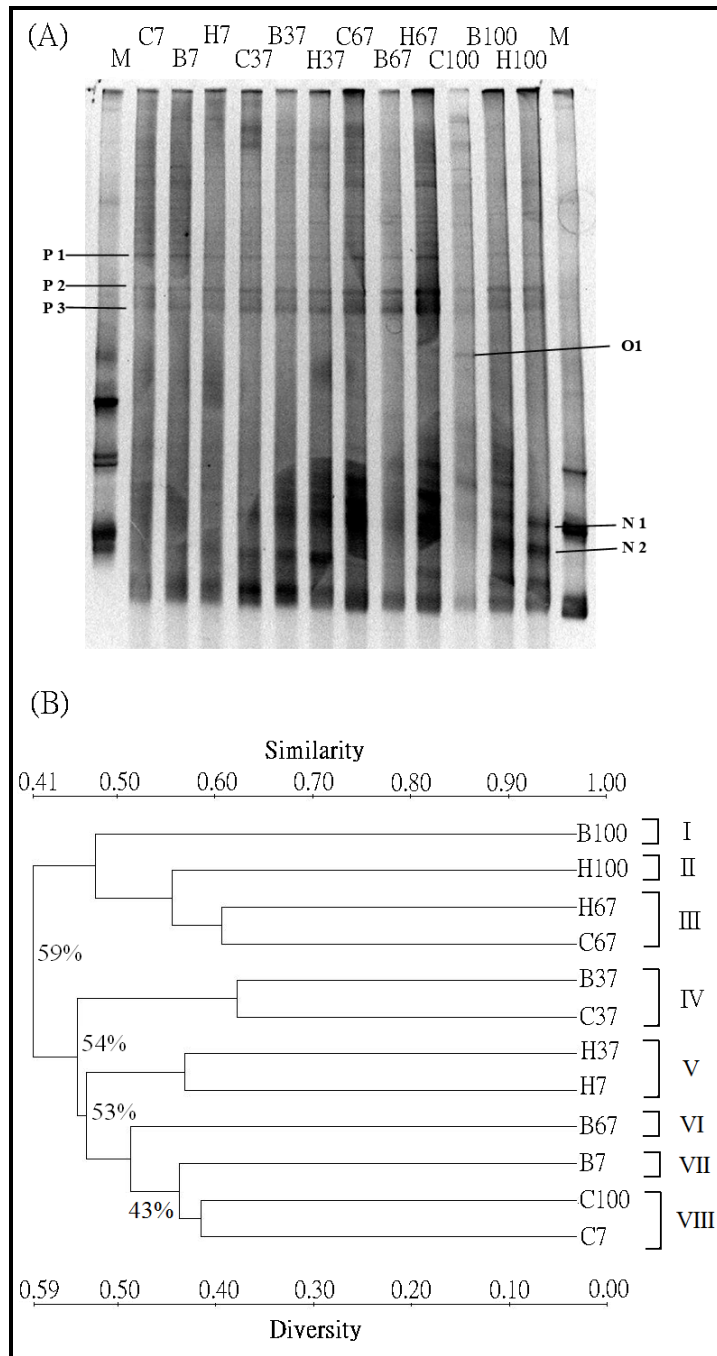


圖 4.9 不同濃度丁基拉草處理下，第 7、37、67 及 100 天下層稻田土壤中之 *nifH* 基因片段的 (A) PCR-DGGE 圖譜及 (B) UPGMA 樹狀圖。代碼字母涵義同圖 4.8。

Fig 4.9 PCR-DGGE profile and the phylogenetic dendrogram of *nifH* gene fragments in lower layer soils under different concentrations of butachlor after 7, 37, 67, and 100 days of rice growth. Figures and capital letters are the same as in Fig 4.8.

(三) 丁基拉草施用下土壤真細菌菌相的改變(非培養法)

本節以 16r DNA 基因片段之 PCR-DGGE 圖譜探討土壤真細菌菌相的改變。圖 4.10-4.11 (A) 為水稻成活、分蘖、開花及成熟期(分別為水稻移植後第 7、第 37、第 67 及第 100 天)的 PCR-DGGE 圖譜,而圖 4.10-4.11 (B) 則為該圖譜之 UPMGA 樹狀圖。不同丁基拉草的施用濃度以字母代碼 C、B 及 H 表示。字母 C 為 control; 字母 B 為施用量 1.5 g are^{-1} ; 字母 H 則為施用量 15 g are^{-1} 。

由圖 4.10 可知,施用丁基拉草所造成上層土壤真細菌菌相的歧異度在水稻移植後第 7 天時為 28%; 第 37 天時為 50%; 第 67 天時為 40%; 第 100 天時為 47.5%。觀察 DGGE 圖譜上主要亮帶變化可知, P1、P3、P4 與 P5 為第 7 至第 100 天所有處理均出現的亮帶; P2 與 P6 為自第 7 天至第 67 天所有處理均出現的亮帶,顯示不同水稻生長時期對微生物菌相的影響; N1 為高倍丁基拉草施用時所出現的亮帶; N2 與 N4 為低倍丁基拉草施用時所出現的亮帶; N3 為兩種濃度丁基拉草施用時均會出現的亮帶。

由圖 4.11 可知,施用丁基拉草所造成下層土壤真細菌菌相的歧異度在水稻移植後第 7 天及第 37 天時為 30%; 第 67 天時為 29%; 第 100 天時為 52%。觀察 DGGE 圖譜上主要亮帶變化可知, O1 為第 7 天時於控制組處理下出現的亮帶; P1-P4 與 P6-P10 為第 7 至第 100 天所有處理均出現的亮帶; P5 及 P11 為第 7 至第 67 天時所有處理均出現的亮帶,顯示不同水稻生長時期對微生物菌相的影響; N1 與 N2 為低濃度丁基拉草處理下均出現的亮帶,顯示土壤微生物對丁基拉草的施用具有不同的適應力。參考主要亮帶存在的位置可知,丁基拉草處理下,受到改變的真細菌菌群其 DNA 的 G+C 含量較受到改變的固氮菌群為低,且其變異量無法以肉眼觀察法分辨之。

上述研究結果顯示,水稻種植期間與丁基拉草的綜合效應可造成土壤好氧菌及兼氣性微生物菌相的改變。值得注意的是,與長期的土壤菌相改變量

相較，丁基拉草施用第七天時，並未造成最大的菌相歧異，並且在下層土壤中，其變異度遠低於固氮菌相的變異量（-23%）。且，該差距隨水稻種植時間（約等於丁基拉草施用時間）拉長而減小。這個現象可能代表游離固氮菌受到丁基拉草施用的影響短期內遠較其他真細菌稻田細菌為大。

不論在土壤真細菌菌相或固氮菌相歧異度，除上層土壤中的真細菌菌相外，觀察均有逐漸上升的趨勢，顯示雖然前人研究中，丁基拉草於砂壤土的半衰期甚短（16天），但其施用對於土壤微生物生態於實驗期間未能恢復成與控制組相同的菌相組成，顯示其所造成的影響可能較預期為大。



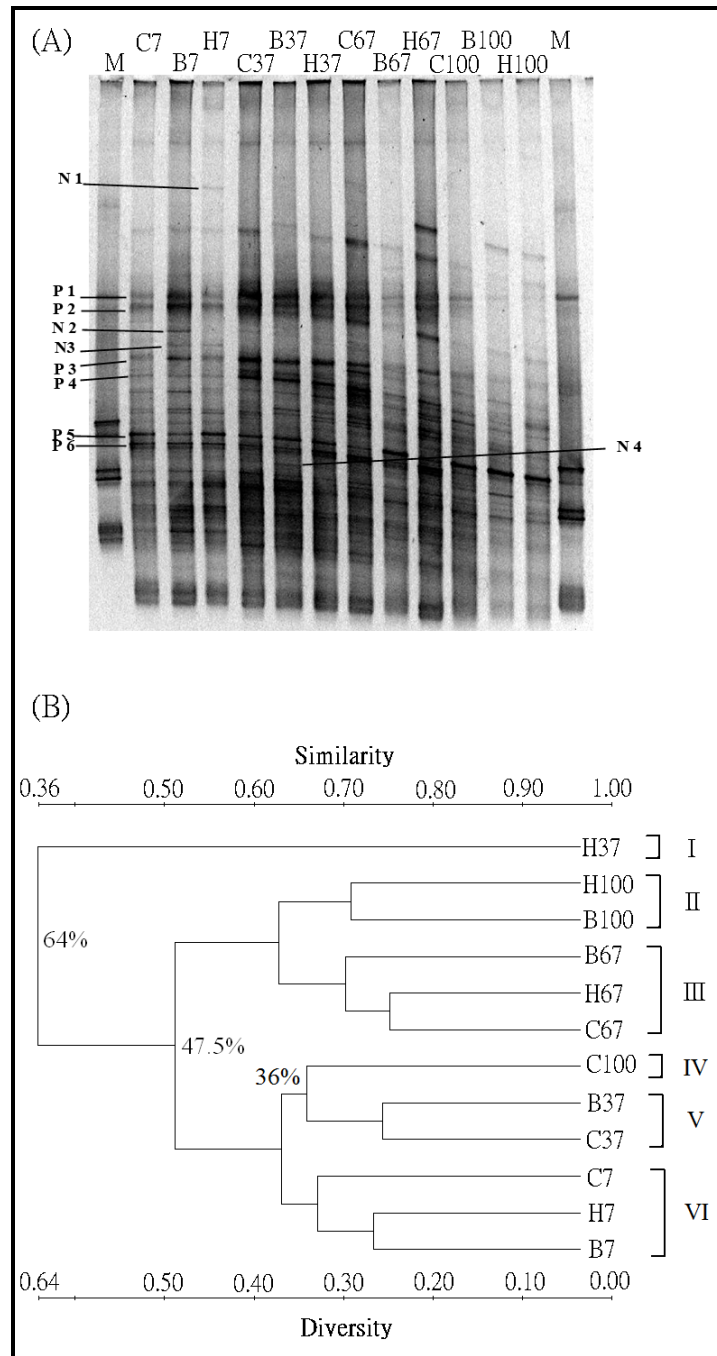


圖 4.10 不同濃度丁基拉草處理下，第 7、37、67 及 100 天上層稻田土壤中之 16s rDNA 基因片段的 (A) PCR-DGGE 圖譜及 (B) UPGMA 樹狀圖。代碼字母涵義同圖 4.8。

Fig 4.10 PCR-DGGE profile and the phylogenetic dendrogram of 16S rDNA fragments in upper layer soils under different concentrations of butachlor after 7, 37, 67, and 100 days of rice growth. Figures and capital letters are the same as in Fig 4.8.

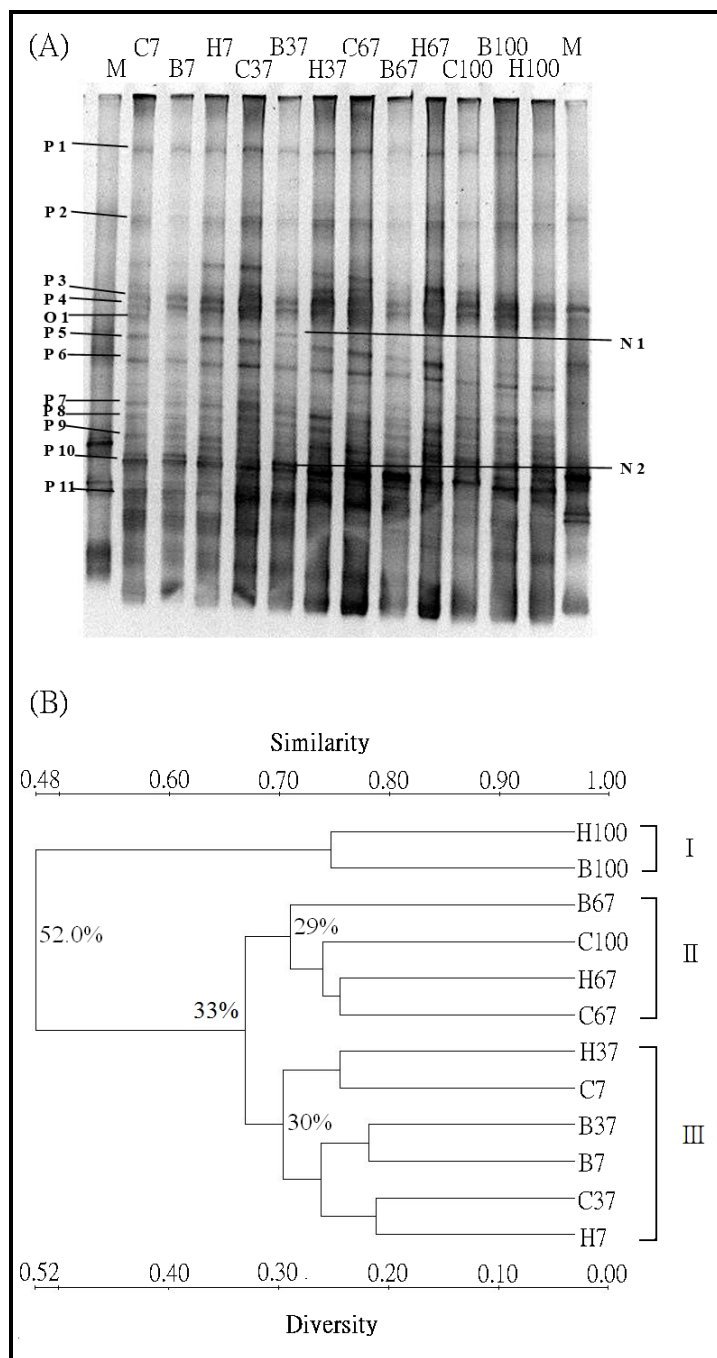


圖 4.11 不同濃度丁基拉草處理下，第 7、37、67 及 100 天下層稻田土壤中之 16s rDNA 基因片段的 (A) PCR-DGGE 圖譜及 (B) UPGMA 樹狀圖。代碼字母涵義同圖 4.8。

Fig 4.11 PCR-DGGE profile and the phylogenic dendrogram of 16S rDNA fragments in upper layer soils under different concentrations of butachlor after 7, 37, 67, and 100 days of rice growth. Figures and capital letters are the same as in Fig 4.8.

(四) 以 MD 統計量決定 UPGMA 圖譜的群數

為了尋求一、進一步分析 PCR-DGGE 亮帶相似度所產生的 UPGMA 圖譜的涵義，及二、將水稻種植因素與丁基拉草因素分開，以探討丁基拉草對稻田土壤中微生物族群產生的影響，吾人參考不同分群數目下的 MD 參數的結果（圖 4.12），以將前兩節中結果所得之 UPGMA 圖譜分群。若能將未添加丁基拉草的控制組與添加丁基拉草的實驗組分於不同族群，則顯示丁基拉草的添加的確顯著地改變了土壤微生物的生態。其中，圖 4.12 A、B、C 及 D 的結果分別用於決定圖 4.8 B、4.9 B、4.10 B 及 4.11 B 的分群數目，依序為：5、8、6 及 3 群，依此分群可在統計上具有顯著分群的意義。

依據上述分群結果，以 36% 作為指標，可將圖 4.8 B 分為 5 個統計上具有顯著差異的小群。分別為：第一群：C100；第二群：B100 與 H100；第三群：C67、H37 與 H67；第四群：C37、B37 與 B67；及第五群：C7、B7、與 H7。

分群結果中，處理相異，但取樣天數相同的結果被分於同一群組，顯示上層土壤中，游離固氮菌族群之分群結果與水稻種植時間較具相關性。但在第二群中，施用丁基拉草的處理被分類於同一群組，顯示於 100 天的水稻種植期中，丁基拉草的施用對微生物的族群具有顯著的影響力。

以 43% 作為指標，可將圖 4.9 B 分為 8 個統計上具有顯著差異的小群。分別為：第一群：B100；第二群：H100；第三群：C67 與 H67；第四群：C37 與 B37；第五群：H7 與 H37；第六群：B67；第七群：B7 及第八群：C7 與 C100。

分群結果與水稻種植時間及丁基拉草的施用均呈現相關性。第 7 天、第 37 天及第 100 天時，高倍的丁基拉草施用可使固氮菌族群產生顯著的變異。第 7、第 67 天及第 100 天時，一倍的丁基拉草施用亦可使固氮菌族群產生顯著的變異。由此結果可知，丁基拉草的施用對固氮菌族群組成的改變於 100 天的水稻種植期中均未能恢復原始狀態。

以 36% 作為指標，可將圖 4.10B 分為 6 個統計上具有顯著差異的小群。分別為：第一群：H37；第二群：B100 與 H100；第三群：C67、B67 與 H67；第四群：C100；第五群：C37 與 B37；及第六群：C7、B7 與 H7。

分群結果與水稻生長時期呈現顯著相關，且第 37 天時，高劑量的丁基拉草添加使上層土壤中真細菌菌相產生顯著的變異。第二群中，施用丁基拉草的處理被分類於同一群組，顯示於 100 天的水稻種植期中，其對真細菌菌族群組成的改變尚未恢復。

以 33% 作為指標，可將圖 4.11B 分為 3 個統計上具有顯著差異的小群。分別為第一群：B100 與 H100；第二群：C67、B67、H67 與 C100 及包含其他所有處理的第三群。

分群結果顯示，丁基拉草的處理長期而言改變了下層土壤中真細菌菌相組成。

由以上結果可知，參考 MD 統計量作為 UPGMA 圖譜分群的指標，可進一步確認丁基拉草對土壤游離固氮菌群及真細菌菌群組成變異的影響。依據此分群原則結果顯示，一、丁基拉草的施用可影響游離固氮菌之菌相組成，且經 100 天的水稻種植期後，未能恢復成原有的菌相狀態；及二、丁基拉草的施用可影響土壤真細菌菌族群組成的菌相組成，且經 100 天的水稻種植期後，亦未能恢復成原有的菌相狀態。

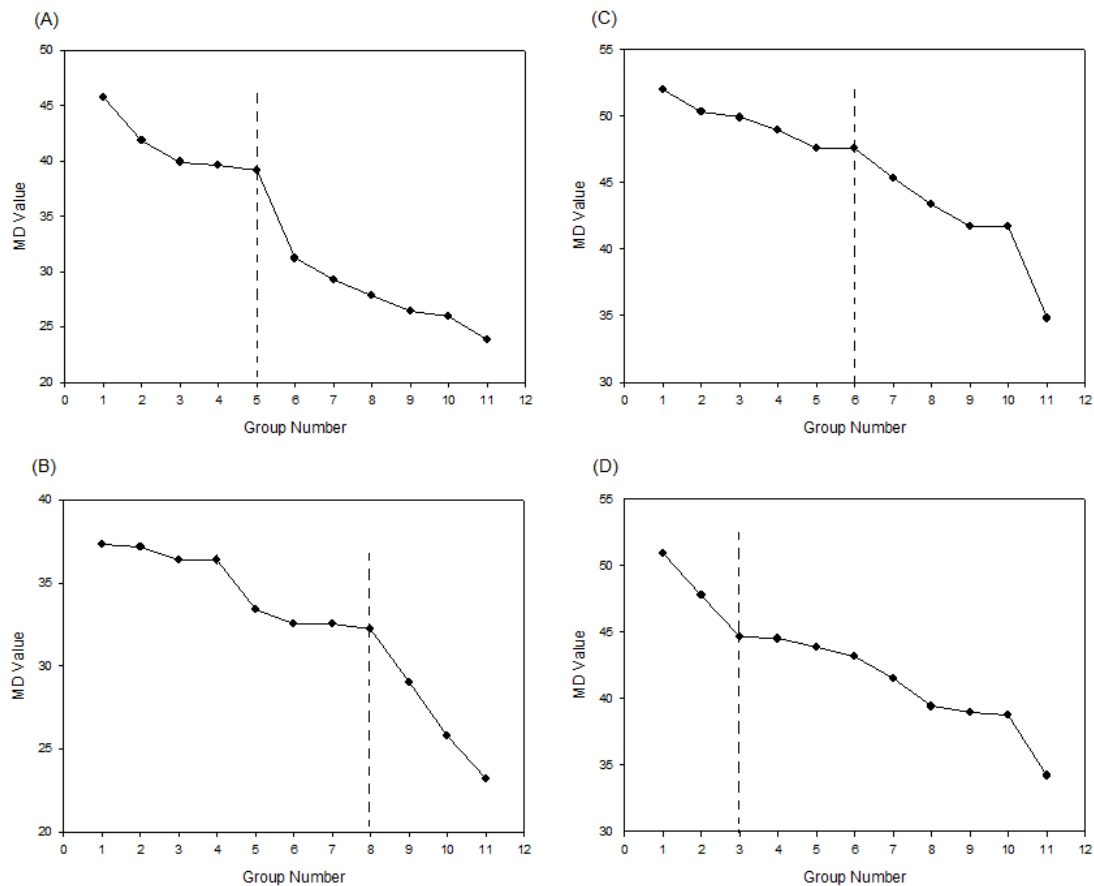


圖 4.12 以 MD 參數的結果決定 UPGMA 分群的數目。MD 的數值為計算 PCR-DGGE 亮帶之歐幾里德距離矩陣後所計算出來的結果。圖 A、B、C 及 D 分別為圖 4.8 B、4.9 B、4.10 B 及 4.11 B 計算後的結果。

Fig 4.12 Determining group numbers of UPGMA dendrograms from MD statistics. The values were calculated from Euclidean distance matrices from PCR-DGGE patterns. Figures A, B, C, and D were the results obtained from Figs. 4.8 B, 4.9 B, 4.10 B and 4.11 B, respectively.

(五) 丁基拉草施用下土壤游離固氮菌的族群變化(可培養法)

為印證本研究前述之 PCR-DGGE 的結果，並使所得的結果能方便地應用於將來的田間操作上，本研究針對水稻栽植第 7 天及第 39 天時的控制組與 15 g are^{-1} 丁基拉草施用量下可培養之土壤游離固氮菌種進行分離、培養並鑑定之。

圖 4.13 為水稻種植第 7 天及第 39 天時， 15 g are^{-1} 丁基拉草施用對土壤真細菌菌與固氮菌之菌數影響。由圖 4.13 (A) 可知，於水稻種植第 7 天時之上層土壤中 (0-3 cm)，丁基拉草的施用使真細菌菌的菌數減少 22.6%，但固氮菌數則增加了 70.6%；於下層土壤中 (3-15 cm)，兩種處理的族群菌數則無顯著的差異。

由圖 4.13 (B) 可知，於水稻種植第 39 天時之上層土壤中 (0-3 cm)，丁基拉草的施用使真細菌菌的菌數減少 56.6%，但固氮菌數則增加了 79.3%；於下層土壤中 (3-15 cm)，丁基拉草的處理使真細菌菌族群數目下降 57.2%；但固氮菌的族群數目則增加了 60.2%。

此結果顯示，高劑量的丁基拉草施用使土壤中的真細菌菌群數目下降，並使游離固氮菌群的數目增加。上述結果與 Das (2006) 的研究結果趨勢相同，即丁基拉草的施用可提升土壤固氮活性與固氮微生物族群數目，以此結果與前一節的結果參照得知，丁基拉草的施用使得土壤的固氮菌數目增加、組成改變；但使得土壤真細菌菌相數目減少、組成改變，但其原因則尚需進一步的研究。

圖 4.14 為水稻種植第 7 天時，由上層土壤 (0-3 cm) 中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are^{-1} 丁基拉草施用下之具有固氮潛力的細菌族群。由結果可知，控制組與丁基拉草施用組所篩選得之全部菌種序列組成差異不大 (13.1%)。於丁基拉草施用下，*Janthinobacterium* sp. 為優勢菌種，但此菌種

亦可於控制組中被分離出來。此菌種屬於 β - 變形菌亞門 (β -proteobacteria)，且該亞門的微生物中，至少三類具有固氮能力。Inoue 等人 (2005) 的研究中顯示，*Janthinobacterium* sp. 為降解 Carbazole (一種含氮的芳香族雜環化物，為染料、藥品及塑膠的原料) 的菌種之一。本研究中顯示 *Janthinobacterium* sp. 可能具有利用空氣中氮素的能力，且不具有形成內孢子的能力。

於控制組所篩選出的菌種中，*Micrococcaceae bacterium* 及 *Streptomyces* sp. 均為放線菌門 (*Actinobacteria*)，該門的微生物常於土壤中被分離出來，且具有 G+C Rich 的 DNA 序列，其中，*Streptomyces* sp. 可能具有形成內孢子的能力。

圖 4.15 為水稻種植第 7 天時，由下層土壤 (3-15 cm) 中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are^{-1} 丁基拉草施用下之具有固氮潛力的細菌族群。由結果可知，控制組與丁基拉草施用組所篩選得之全部菌種序列組成差異不大 (19.1%)。

於丁基拉草施用下，*Arthrobacter* sp. 為稻田土壤中的優勢菌種，其固氮能力亦曾於被 Smyk 及 Ettliger (1963) 所報導。*Arthrobacter globiformis* 則未有正式的報告顯示其具有固氮的能力，本研究中顯示其可能具有固定空氣中氮素的能力。

於控制組土壤中，*Arthrobacter*、*Bacillus*、*Paenibacillus* 及 *Streptomyces* 為可被分離培養得之。其中 *Paenibacillus* sp. 為土壤中曾被分離出的固氮菌種，並可藉由分泌植物荷爾蒙、提供養分或與植物病菌產生拮抗等方式成為促進植物生長的益菌 (Pettersson et al., 1999)。其中，*Bacillus* 及 *Streptomyces* 可能具有形成內孢子的能力。

由第 7 天可培養菌種的數據顯示，上下層土壤中，其可培養的菌種不同。於控制組中，*Bacillus* 及 *Streptomyces* 兩菌種於上下層土壤中均可被分離出來，可顯示該兩類菌種對生存環境的適應力可能較大。於丁基拉草施用下，上層土壤中的可培養的優勢固氮菌種可能為 *Janthinobacterium* sp.，而在下層

土壤中，則為 *Arthrobacter* sp.。

圖 4.16 為水稻種植第 39 天時，由上層土壤 (0-3 cm) 中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are⁻¹ 丁基拉草施用下之具有固氮潛力的細菌族群。由結果可知，控制組與丁基拉草施用組所篩選得之全部菌種序列組成差異為 14.6%，與第 7 天的 13.1% 比較無顯著差異。

於丁基拉草施用下，其可培養出之菌種為 *Arthrobacter* sp.、*Bacillus megaterium*、*Rhizobium* sp.、*Roseateles* sp. 及 *Streptomyces recifensis*。其中，曾有研究顯示 *Bacillus megaterium* 具有降解醃胺類除草劑的能力 (Wang et al., 2008)，且具有 *nifH* 基因序列 (Ding et al., 2005)，且具有形成內孢子的能力。在圖 4.16 中，可以發現三種 *Arthrobacter* sp.、*B. megaterium* 及 *S. recifensis* 屬於同一聚類，顯示丁基拉草的施用使得菌群結構改變。*S. recifensis* 並為一種可促進多種植物生長的土壤微生物菌群 (Sokolova et al., 2004)。

於控制組中，其優勢菌種為 *Enterobacter* sp.、*Herbaspirillum putei*、*Rhizobium* sp.、*Roseateles* sp.、*Pseudomonas* sp. 及 *Xanthomonas* sp. 且除了 *Roseateles* sp. 外，均曾有研究顯示其具有固氮的能力 (Sigh et al., 1983; Baldani et al., 1996; Kirchhof et al., 2001)。

圖 4.17 為水稻種植第 39 天時，由下層土壤 (3-15 cm) 中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are⁻¹ 丁基拉草施用下之具有固氮潛力的細菌族群。由結果可知，控制組與丁基拉草施用組所篩選得之全部菌種序列組成差異為 13.1%，較第 7 天的 19.1% 減小約 6%。

於丁基拉草施用下，其優勢菌種為 *Azospirillum doebereinae*、*Agrobacterium tumefaciens*、*Bacillus* sp.、*Brucella suis*、*Pseudomonas* sp. 及 *Roseateles* sp.。除 *B. suis* 及 *Roseateles* sp. 外，其他菌種於前人研究中均曾顯示其具有固氮的能力。值得注意的是，*Brucella suis* 為 1950 年代第一個被美軍使用於生化武器上的病原菌，可感染軍隊、市民及污染食物的來源 (Paulsen et al., 2002)，其中，只有 *Bacillus* sp. 可能具有形成內孢子的能力。

於控制組中，其可篩選出的可培養性菌種為 *Arthrobacter* sp.、*Azospirillum*

sp.、*A. oryzae*、*B. suis*、*Duganella nigrescens*。其中，*D. nigrescens* 屬於 β - 變形菌亞門 (β - proteobacteria)，為一新發現的菌種，且至目前為止尚未有正式的研究。

由第 39 天菌種序列的資料顯示，下層土壤中菌種變異較第 7 天時減小，可能是土壤於灌水還原境況下利於某些菌種存活所致。於丁基拉草施用下所篩選出的菌種與控制組差異甚大，上層土壤中僅有兩株菌種相同，而下層土壤中僅有一株菌種相同，顯示丁基拉草的施用的確改變了可培養性固氮菌群的種類，此結果與本研究 PCR-DGGE 的結果相符。並且，於水稻種植第 39 天時之上下層土壤中，其游離固氮菌種類均較第 7 天時多樣，但其固氮效能的提升是否為前述菌株所貢獻，尚須經由實驗證實。

由本研究先前的結果顯示，土壤中的固氮菌菌相變異可能一、傾向於固氮活性較高者生存或二、可能不利於其他菌種生存。因微生物可能藉形成內孢子的方式度過生存逆境，若將丁基拉草的施用視為微生物生存的逆境，則內孢子的形成與否為微生物組成變異的可能原因之一。但從上述的實驗結果無法支持此項論點，因此丁基拉草施用所造成微生物菌相的差異原因尚待進一步的實驗證實。

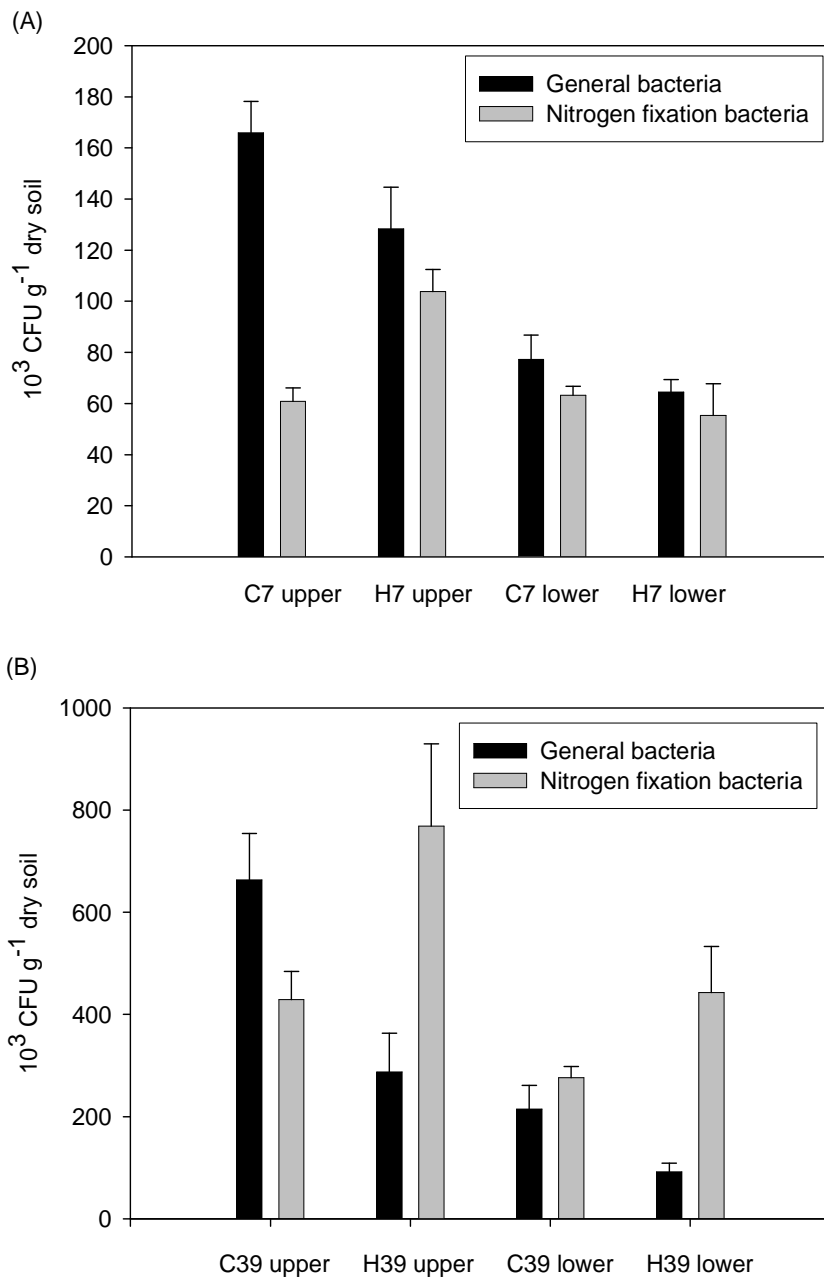


圖 4.13 水稻種植第 7 天 (A) 及第 39 天 (B) 時，15 g are⁻¹ 丁基拉草施用對土壤真細菌菌及固氮菌之菌數影響。C，Control； H，15 g are⁻¹ 丁基拉草施用；數字代表水稻種植天數；upper，0-3 cm 土壤；lower，3-15 cm 土壤。
(轉下頁)

(Cont.)

Fig 4.13 Effect of 15 g are^{-1} butachlor application on population of general and nitrogen fixation bacteria in paddy soil after 7 (A) and 39 (B) days of rice cultivation. C, control; H, 15 g are^{-1} butachlor application; numbers present the days after rice transplanting; upper, 0-3 cm soil; lower, 3-15 cm soil



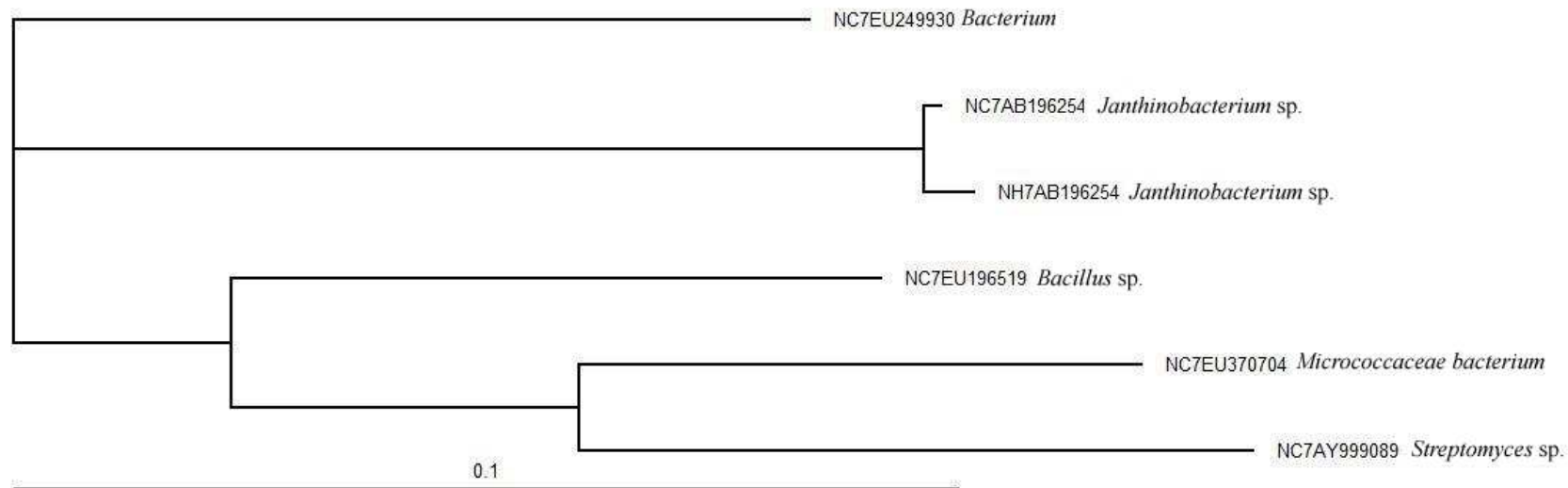


圖 4.14 水稻種植第 7 天時，由上層土壤 (0-3 cm) 中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are^{-1} 丁基拉草施用下之具有固氮潛力的細菌族群。刻度尺表示 10% 序列的差異。代號依序為 N，固氮菌；C，Control/H， 15 g are^{-1} 丁基拉草施用，NCBI 所使用之菌株 Accession Number，所代表之菌種名稱。

Fig 4.14 Isolated potential free-living nitrogen-fixation bacteria in upper layer (0-3 cm) soils after 7 days of rice cultivation. Scale indicates 10% sequence divergence. The codewords are N, nitrogen-fixation bacteria, C, control/H, 15 g are^{-1} butachlor application, the accession number in NCBI, and names of the bacteria, respectively.

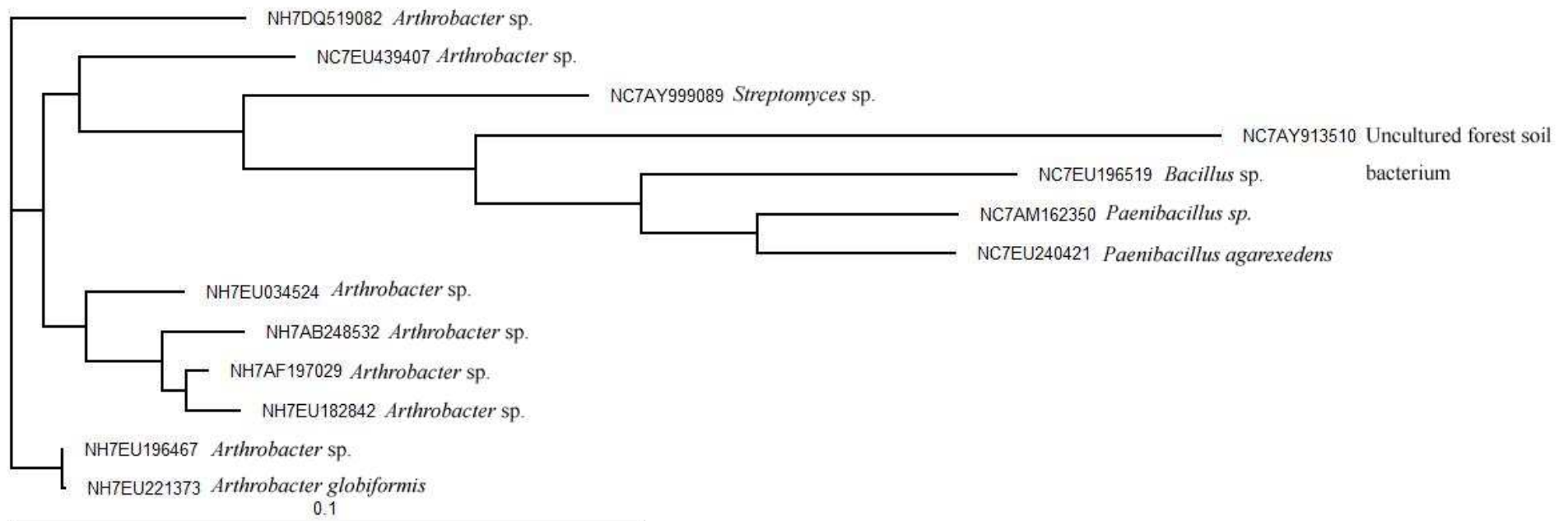


圖 4.15 水稻種植第 7 天時，由下層土壤（3-15 cm）中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are⁻¹ 丁基拉草施用下之具有固氮潛力的細菌族群。刻度尺與代號意義同圖 4.14。

Fig 4.15 Isolated potential free-living nitrogen-fixation bacteria in lower layer (3-15 cm) soils after 7 days of rice cultivation. Meanings of the scale and codewords are the same with Fig. 4.14.

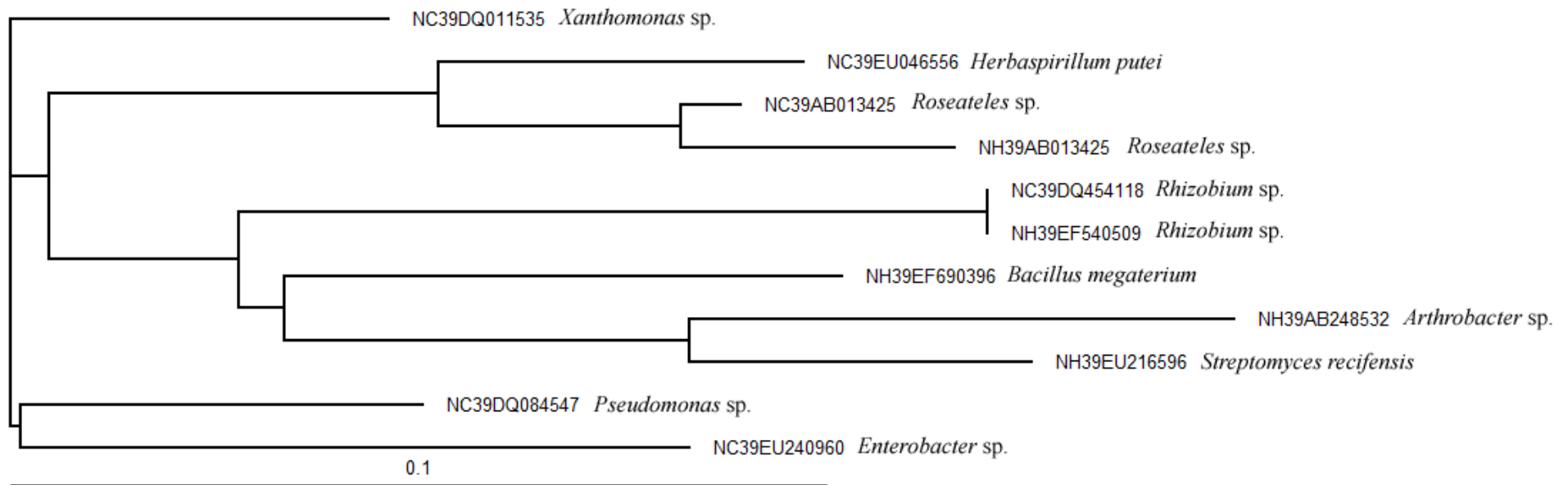


圖 4.16 水稻種植第 39 天時，由上層土壤（0-3 cm）中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are⁻¹ 丁基拉草施用下之具有固氮潛力的細菌族群。刻度尺與代號意義同圖 4.14。

Fig 4.16 Isolated potential free-living nitrogen-fixation bacteria in lower layer (0-3 cm) soils after 39 days of rice cultivation. Meanings of the scale and codewords are the same with Fig. 4.14.

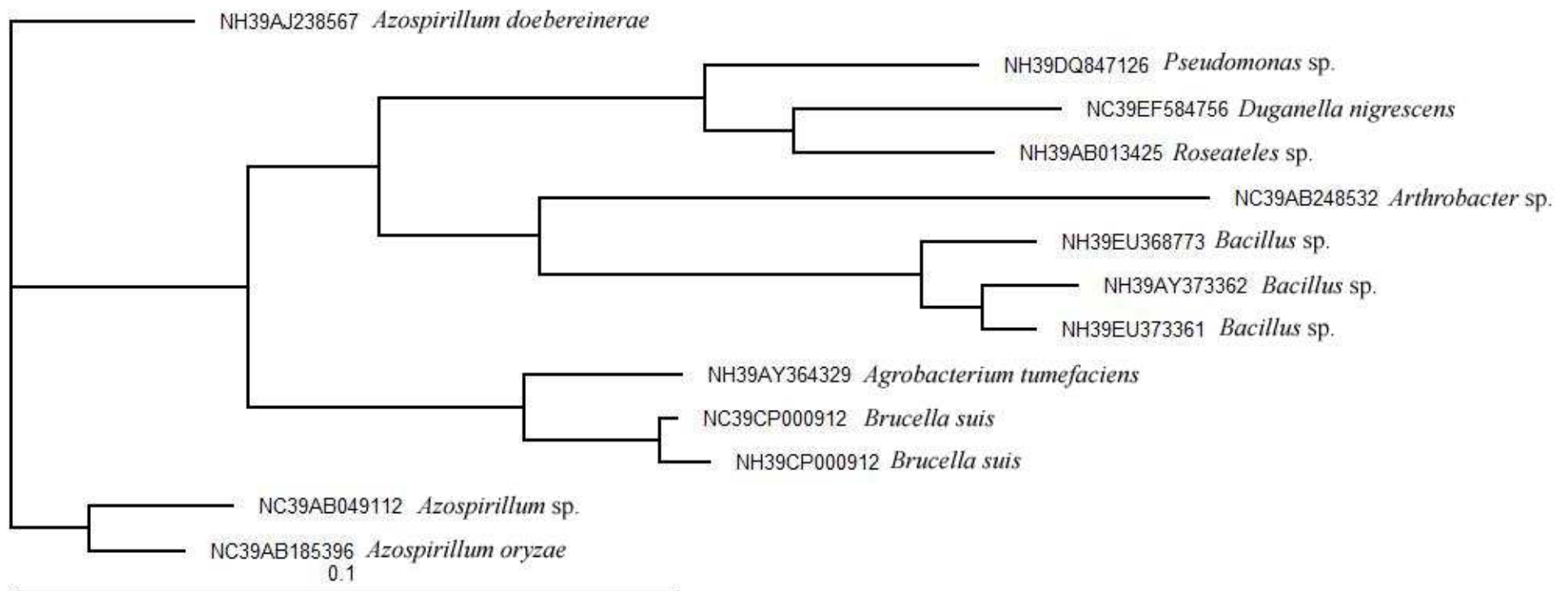


圖 4.17 水稻種植第 39 天時，由下層土壤（3-15 cm）中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are^{-1} 丁基拉草施用下之具有固氮潛力的細菌族群。刻度尺與代號意義同圖 4.14。

Fig 4.17 Isolated potential free-living nitrogen-fixation bacteria in lower layer (0-3 cm) soils after 39 days of rice cultivation. Meanings of the scale and codewords are the same with Fig. 4.14.

(六) 丁基拉草施用下土壤細菌的族群變化(可培養法)

為與 PCR-DGGE 及可培養性固氮菌之鑑定結果相互參照，本研究針對水稻栽植第 7 天及第 39 天時的控制組與 15 g are^{-1} 丁基拉草施用量下之土壤細菌菌種進行分離、培養並鑑定之。

圖 4.18 為水稻種植第 7 天時，由上層土壤 (0-3 cm) 中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are^{-1} 丁基拉草施用下之細菌族群。由結果可知，控制組與丁基拉草施用組所篩選得之全部菌種序列組成差異為 19.3%。

於丁基拉草施用下，其優勢菌種多為 *Bacillus* 菌屬 (81.8%)，其中，*B. niacini* 可能具有降解醃胺類除草劑的能力 (Wang et al., 2008)，且為 *Bacillus* 菌屬中種類最豐富的菌種 (~15%) (Garbeva et al., 2003)。*B. alcalophilus* 與 *B. thuringiensis* 適合於鹼性環境下生長 (Lewis et al., 1981; Schnepf et al., 1998)。*B. thuringiensis* 中文命名為蘇力菌，是一種昆蟲病原菌，目前廣泛應用於天然物殺蟲劑中，且於前人研究中尚發現其具有降解醃胺類除草劑的能力 (Wang et al., 2008)，並具有形成內孢子的能力。*B. circulans* 為植物生長促進的根圈細菌 (Plant Growth Promoting Rhizobacteria，簡稱 PGPR)，可有效提升玉米產量達 50.8% (Tilak and Srinivasa Reddy, 2006)。此外，*Paenibacillus alvei* 為感染蜜蜂幼蟲腐臭病 (*Melissococcus pluton*) 的蜜蜂幼蟲上最常被分離出的細菌種類 (Bailey and Ball, 1991)，且於土壤中可被分離出來 (Smirnov, 1976)。*Telluria mixta* 為絕對土壤中的絕對好氧菌，且可降解多醣類 (Bowman et al., 1993)。

於控制組中，其優勢菌種亦多為 *Bacillus* 菌屬 (72.7%)，其中，*B. niacini*、*B. megaterium* 及 *B. cereus* 於前人研究中均具有降解醃胺類除草劑的能力 (Wang et al., 2008)，並且，*B. megaterium* 及 *B. cereu* 均具有形成內孢子的能力。此外，*Janthinobacterium* sp. 及 *Paenibacillus* sp. 亦可於無氮培養基中生長 (圖 4.14-4.15)，顯示其對生長環境的適應力強。

兩種處理下的真細菌種類及序列差異不大，顯示丁基拉草的施用於可培

養性的細菌菌群中所造成的影響甚小。

圖 4.19 為水稻種植第 7 天時，由下層土壤（3-15 cm）中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are⁻¹ 丁基拉草施用下之細菌族群。由結果可知，控制組與丁基拉草施用組所篩選得之全部菌種序列組成差異為 16.2%。

於丁基拉草施用下，其優勢菌種多為 *Bacillus* 菌屬（90.0%），包含 *B. alcalophilus*、*B. cereus* 及 *B. niacini*，且均可於上層土壤中被分離出來，顯示上述菌群對於不同土壤還原境況均具有適應的能力。

於控制組中，其優勢菌種亦多為 *Bacillus* 菌屬（80.0%），且與丁基拉草處理下的菌群序列差異不大，顯示丁基拉草的施用於可培養性的細菌菌群中所造成的影響甚小。

圖 4.20 為水稻種植第 39 天時，由上層土壤（0-3 cm）中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are⁻¹ 丁基拉草施用下之真細菌菌族群。由結果可知，控制組與丁基拉草施用組所篩選得之全部菌種序列組成差異為 15.7%。

於丁基拉草施用下，其優勢菌種多為 *Bacillus* 菌屬（55.6%），包含 *B. flexus*、*B. niacini* 及 *B. thuringiensis*，但與第 7 天時相較下降 26.2%。其中，*B. flexus* 與大豆根瘤菌中篩選出之菌種具有極高的相似度（Bai et al., 2002）。*Chryseobacterium* sp.、*Acidovorax* sp. 與 *Roseateles* sp. 亦為高倍丁基拉草施用下所篩選而得的細菌菌種，但其與控制組所篩選出之菌種具有頗高的相似度，*Chryseobacterium* sp. 可能為植物生長促進的根圈細菌，且可能與大豆根瘤菌 *Sinorhizobium fredii* 共同促進植物的生長及固氮作用（Lucas García et al., 2004）。

於控制組中，*Bacillus* 菌屬佔 30.0%，與第 7 天時相較下降 42.7%，顯示土壤微生物相隨水稻種植時間而改變的趨勢。由控制組土壤所篩選出的 *Herbaspirillum* sp.，為一具有 *nifH* 基因的固氮菌種（Baldani et al., 1996; Kirchof et al., 2001），由於本研究中亦篩選出相似菌種，顯示該菌種於台灣土壤中可能分佈甚廣。

控制組與丁基拉草施用下之兩種處理間序列差異不大，顯示丁基拉草的

施用於可培養性的細菌菌群中造成的影響甚小。

圖 4.21 為水稻種植第 39 天時，由下層土壤 (3-15 cm) 中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are^{-1} 丁基拉草施用下之細菌族群。由結果可知，控制組與丁基拉草施用組所篩選得之全部菌種序列組成差異為 12.9%，

於丁基拉草施用下，其優勢菌種多為 *Bacillus* 菌屬 (57.1%)，包含 *B. megaterium* 及 *B. thuringiensis*。此外，*Paenibacillus alginolyticus* 為土壤中分離出可降解 xanthan 之菌種 (Ruijssenaars et al., 1999)，與 *Arthrobacter* 菌屬均可自丁基拉草施用的土壤中篩選出來。

於控制組中，其優勢菌種亦多為 *Bacillus* 菌屬 (57.1%)，包含 *Bacillus niacini* 及其他 *Bacillus* sp.。此外 *Arthrobacter globiformis* 與其他 *Arthrobacter* sp. 亦可自土壤中篩選出來。

兩種處理間序列差異不大，顯示丁基拉草的施用於可培養性的細菌菌群中造成的影響甚小。

由上述結果可知，兩種處理下，可培養性的細菌菌相隨水稻的種植時期而改變，初期的優勢菌種以 *Bacillus* 菌屬為主，但在第 39 天時，其他菌屬如 *Arthrobacter*、*Paenibacillus* 等亦於培養基中被發現。與在游離固氮菌的觀察結果不同，可培養性的細菌菌相於高倍丁基拉草的處理下未發現與控制組的顯著差異，與前一部份的結果相似，丁基拉草施用下存活的細菌種類可能並非以內孢子的有無作為篩選的依據，詳細的原因尚待進一步的實驗證實。

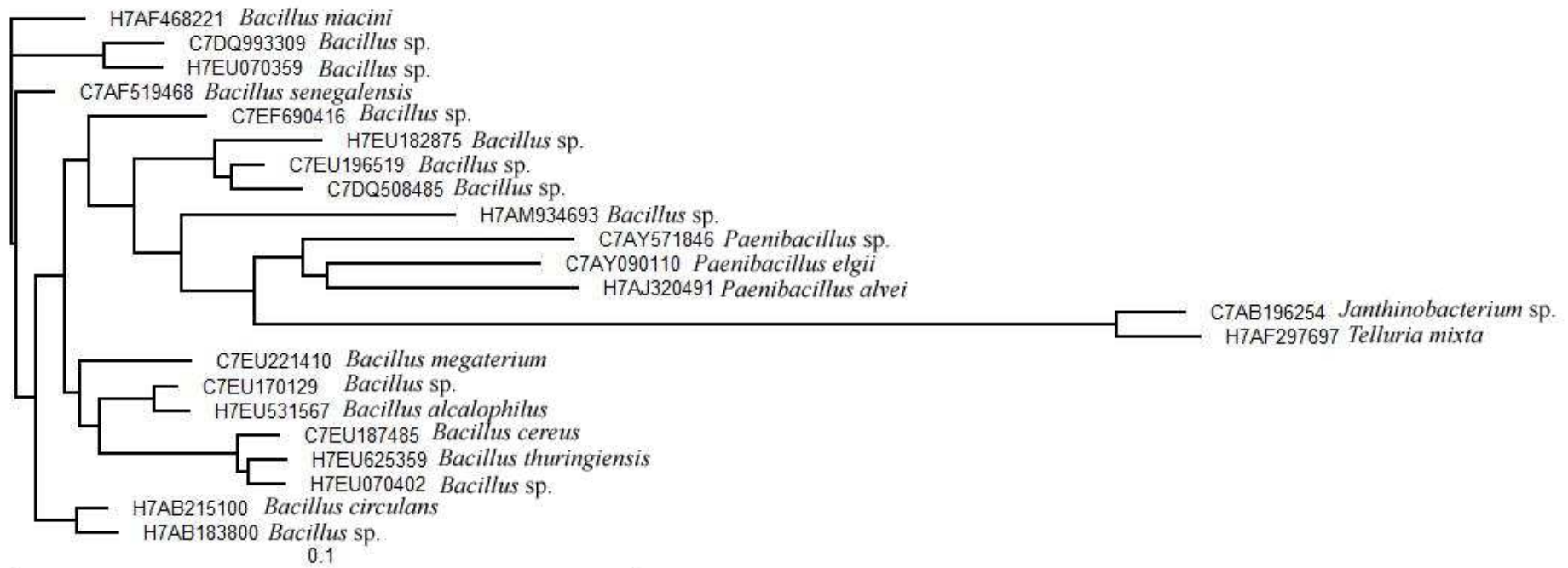


圖 4.18 水稻種植第 7 天時，由上層土壤 (0-3 cm) 中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are⁻¹ 丁基拉草施用下之細菌族群。刻度尺與代號意義同圖 4.14。

Fig 4.18 Isolated bacteria in upper layer (0-3 cm) soils after 7 days of rice cultivation. Meanings of the scale and codewords are the same with Fig. 4.14.

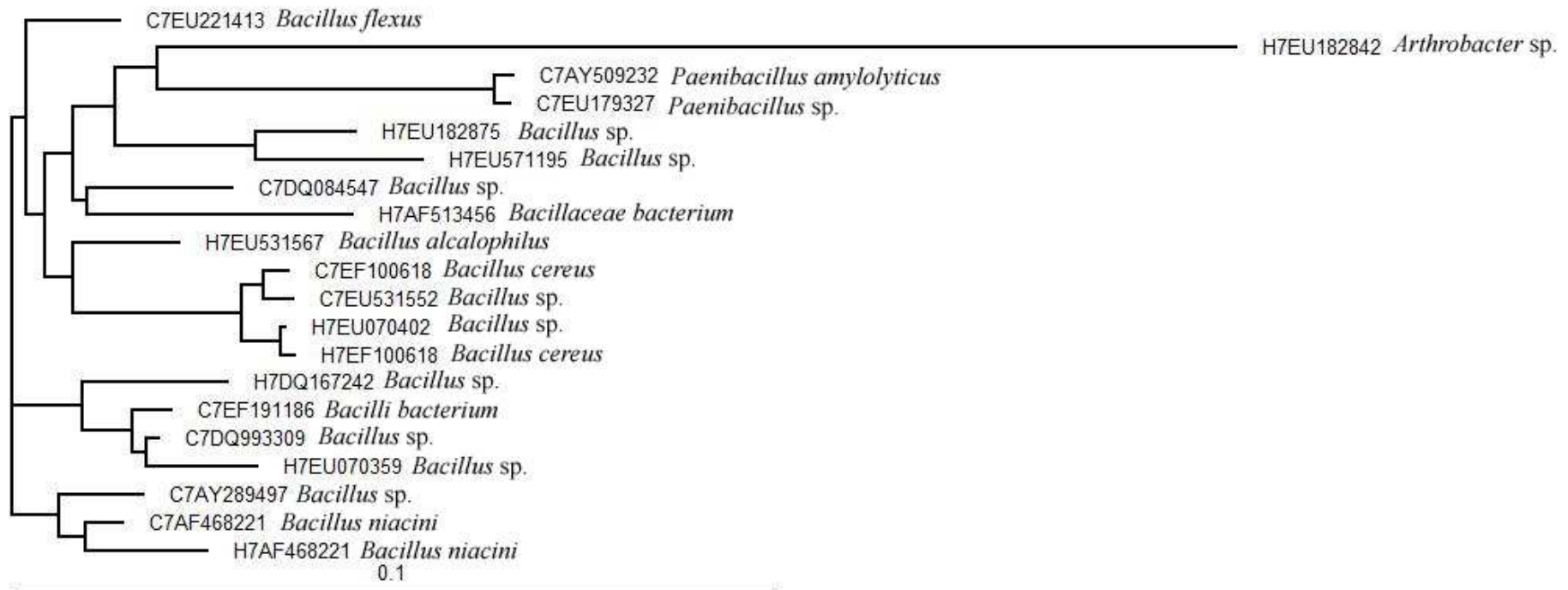


圖 4.19 水稻種植第 7 天時，由下層土壤（3-15 cm）中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are^{-1} 丁基拉草施用下之細菌族群。刻度尺與代號意義同圖 4.14。

Fig 4.19 Isolated bacteria in lower layer (3-15 cm) soils after 7 days of rice cultivation. Meanings of the scale and codewords are the same with Fig. 4.14.

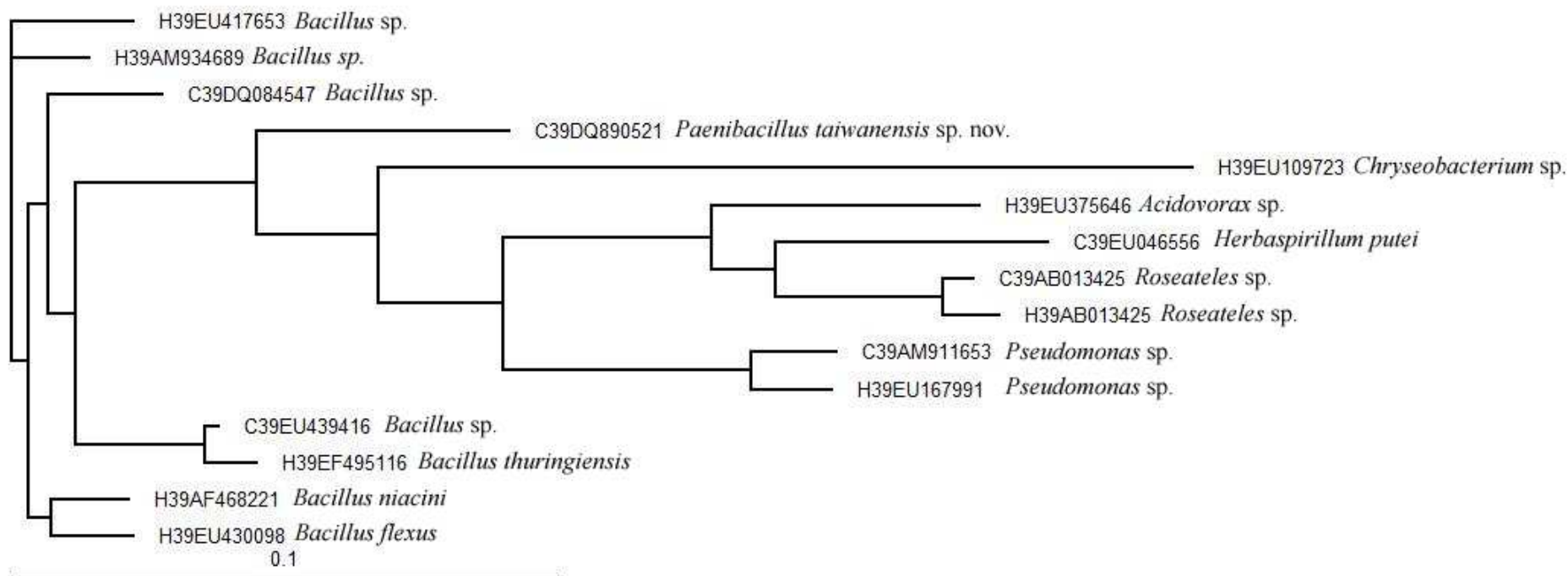


圖 4.20 水稻種植第 39 天時，由上層土壤（0-3 cm）中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are^{-1} 丁基拉草施用下之細菌族群。刻度尺與代號意義同圖 4.14。

Fig 4.20 Isolated bacteria in upper layer (0-3 cm) soils after 39 days of rice cultivation. Meanings of the scale and codewords are the same with Fig. 4.14.

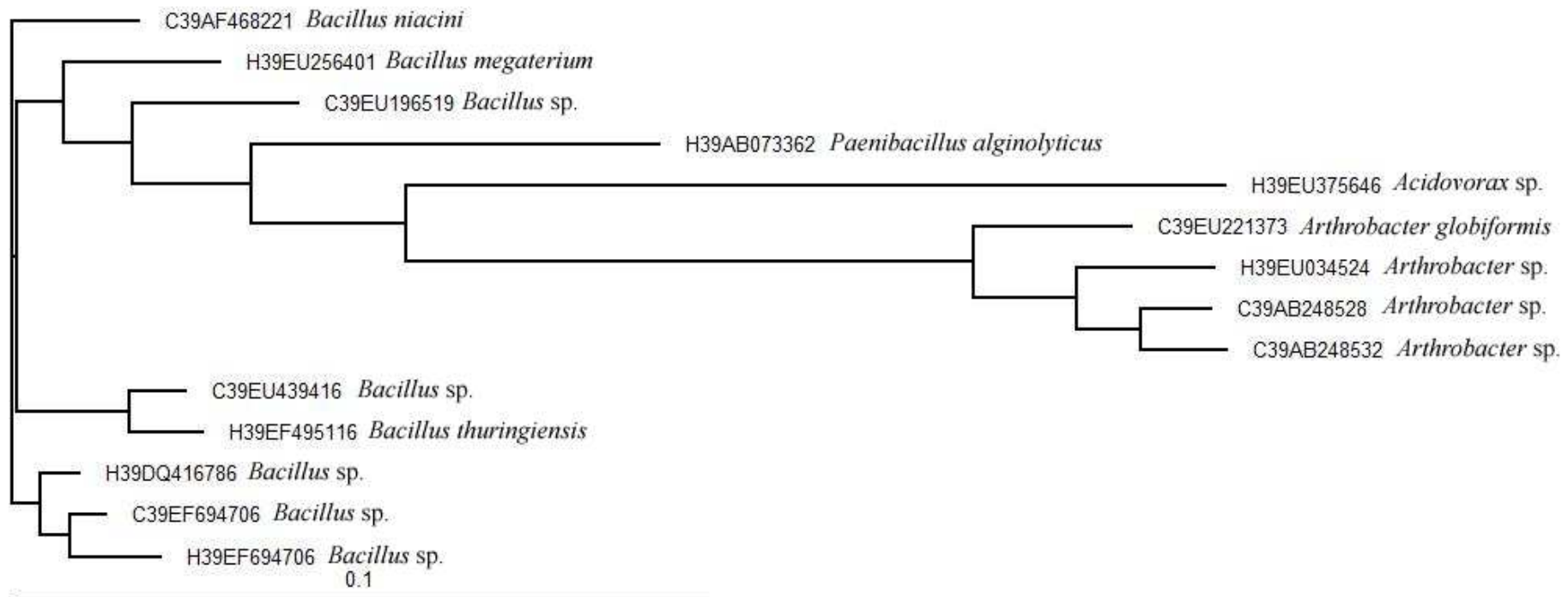


圖 4.21 水稻種植第 39 天時，由下層土壤（3-15 cm）中分離、培養並鑑定控制組與 15 g are⁻¹ 丁基拉草施用下之細菌族群。刻度尺與代號意義同圖 4.14。

Fig 4.21 Isolated bacteria in lower layer (3-15 cm) soils after 39 days of rice cultivation. Meanings of the scale and codewords are the same with Fig. 4.14.

五、結論

生物的多樣性與生態系統的功能性是緊密相連的，而生態多樣性降低的原因往往來自於人類農業操作的增加。以現今發展出的分子生物學技術從事研究可以較過去更為精確地描述土壤微生物生態受到人類農業操作的改變情形，也因此，成為吾人評估生態差異的重要工具。雖然如此，傳統的菌種培養觀察與培養技術因其方便應用於實際操作的關係，亦有其研究的必要性。

本研究於溫室栽培水稻，分別施用兩種濃度的丁基拉草，並於不同時間點採取樣品分析調查土壤固氮活性、土壤固氮菌及真細菌菌相組成的差異，以期評估除草劑丁基拉草於水稻種植期間，對稻田土壤中固氮活性與微生物多樣性所造成的長期效應。

本研究所得結果為：

一、水稻成活期時，於上層土壤中，兩種濃度的丁基拉草施用皆能顯著地提高土壤的固氮活性。但在水稻成熟期時，只有高濃度的丁基拉草施用可以提升土壤的固氮活性。於下層土壤中，兩種濃度的丁基拉草施用皆能顯著地提高土壤的固氮活性，並且於水稻成熟期時，高濃度的丁基拉草施用較低濃度丁基拉草施用更能顯著地促進土壤固氮作用。

二、水稻種植期間與丁基拉草的綜合效應可造成表土及裏土中土壤固氮菌相的改變，尤其水稻存活期時，以裏土中之固氮菌相受其改變較巨。但長期而言，不論是表土或裏土之游離固氮菌相均維持 50% 以上的變異。對應於土壤固氮活性的變化情形，顯示土壤中的固氮菌相變異可能傾向於固氮活性較高者生存。此外，丁基拉草處理下，可能利於某些 DNA 中 G+C 含量較高游離固氮菌群存活及作用。

三、水稻種植期間與丁基拉草的綜合效應可造成土壤好氣菌及兼氣性微生

物菌相的改變。丁基拉草處理下，受到改變的真細菌菌群其 DNA 的 G+C 含量較受到改變的固氮菌群為低，且其變異量無法以肉眼觀察法分辨之。

四、由 MD 統計量決定 UPGMA 圖譜分群的結果顯示，丁基拉草的施用可影響游離固氮菌及真細菌菌族群之菌相組成，且經 100 天的水稻種植期後，未能恢復成原有的菌相狀態。

五、高劑量的丁基拉草施用使土壤中的真細菌菌群數目下降，並使游離固氮菌群的數目增加。

六、水稻種植第 7 天時，在高倍丁基拉草施用下，上層土壤中的可培養性優勢固氮菌種可能為 *Janthinobacterium* sp.，而在下層土壤中，則為 *Arthrobacter* sp.；在第 39 天時，固氮菌的族群種類變多。

七、於可培養性的土壤真細菌菌相上，無論是否施用丁基拉草，其菌相差異不大，且以 *Bacillus* sp. 為大宗。

由上述結果可知，丁基拉草的施用對於土壤的菌相及數目可能具有長期的改變效應，此效應對於固氮菌族群短期內衝擊大，也造成土壤固氮作用的上升。

參考文獻

- 王一雄。1997。農藥及其重要性，p. 284。土壤環境污染與農藥。國立編譯館主編。
- 行政院農業委員會。2005。土地。94年農業統計年報。行政院農業委員會。
[On line] <http://www.coa.gov.tw/view.php?catid=11173>。
- 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所。2004。雜草防除。植物保護手冊。
行政院農業委員會。[On line] <http://www.tactri.gov.tw/htdocs/ppmtable>。
- 沈明來。1998。集群分析，p. 381。實用多變數分析。九州圖書文物有限公司。
- 邱子權。2004。有機氯化烴殺蟲劑厭氧微生物降解作用與其菌群結構之研究。國立台灣大學農業化學研究所博士論文。
- 邱建中。1985。醃胺類殺草劑。台中區農推專訊。行政院農業委員會台中區農業改良場。[On line] <http://www.tdais.gov.tw/search/book3/41-50/45.htm>
- 張秀齡。2001。醃胺類除草劑在不同土壤中的吸附、降解及移動之研究。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。
- Arnold, W., A. Rump, W. Klipp, U. B. Priefer and A. Pühler. 1988. Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. J. Mol. Biol. 203:715-738.
- Ateeq, B., M. A. Farah, M. N. Ali and W. Ahmad. 2002. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2, 4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. Mutat. Res. 514:105-113.
- Bai, Y., F. D'Aoust, D. L. Smith and B. T. Driscoll. 2002. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. Can. J. Microbiol. 48:230-238. F
- Bailey, L. and B. V. Ball. 1991. Honey bee pathogeny, 2nd ed., p 36-41. Harcourt Brace Jovanovich, Sidcup, U. K.
- Balandreau, J., G. Rinaudo, I. Fares-Hamad and Y. Dommergues. 1975. Nitrogen

- fixation in the rhizosphere of rice plants, p. 57-70. In W. D. P. Stewart, (ed.), Nitrogen fixation by free-living micro-organisms. Cambridge University Press, London.
- Baldani, J. I., B. Pot, G. Kirchhof, E. Falsen, V. L. Baldani, F. L. Olivares, B. Hoste, K. Kersters, A. Hartmann, M. Gillis and J. Döbereiner. 1996. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. Int. J. Syst. Bacteriol. 46:802–810.
- Baldani, J. I., L. Caruso, V. L. D. Baldani, S. R. Goi and J. Döbereiner. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. Soil Biol. Biochem. 29:911-922.
- Benelli, E. M., E. M. Souza, S. Funayama, L. U. Rigo and F. O. Pedrosa. 1997. Evidence for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. J. Bacteriol. 179:4623-4626.
- Boriollo, M. F. G., E. A. R. Rosa, R. B. Gonçalves and J. F. Höfling. 2006. Parity among interpretation methods of MLEE patterns and disparity among clustering methods in epidemiological typing of *Candida albicans*. J. Microbiol. Methods 64:346-365.
- Borneman, J., P. W. Skroch, K. M. O'Sullivan, J. A. Palus, N. G. Rumjanek, J. L. Jansen, J. Nienhuis and E. W. Triplett. 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. Appl. Environ. Microbiol. 62:1935-1943.
- Bowman, J. P., L. I. Sly, A. C. Hayward, Y. Spiegel and E. Stackebrandt. 1993. *Telluria mixta* (*Pseudomonas mixta* Bowman, Sly, and Hayward 1988) gen. nov., comb. nov., and *Telluria chitinolytica* sp. nov., soil-dwelling organisms which actively degrade polysaccharides. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 43:120-124.
- Butler, S. J., J. A. Vickery and K. Norris. 2007. Farmland biodiversity and the footprint of agriculture. Science 315:381-384.
- Cariço, J. A., F. R. Pinto, C. Simas, S. Nunes, N. G. Sousa, N. Frazão, H. de Lencastre and J. S. Almeida. 2005. Assessment of band-based similarity

- coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 43:5483-5490.
- Carson, R. 1962. *Silent Spring*. Riverside Press, Cambridge.
- Cedergreen, N., P. Kudsk, S. K. Mathiassen and J. C. Streibig. 2007. Combination effects of herbicides on plants and algae: do species and test systems matter? *Pest Manag. Sci.* 63:282-295.
- Chalk, P. M. 1991. The contribution of associative and symbiotic nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of non-legumes. *Plant Soil* 132:29-39.
- Charyalu, P. B. B. N., D. N. Nayak and V. R. Rao. 1981. $^{15}\text{N}_2$ incorporation by rhizosphere soil. Influence of rice variety, organic matter and combined nitrogen. *Plant Soil* 59:399-405.
- Chiang, H. C., J. R. Duh and Y. S. Wang. 2001. Butachlor, thiobencarb, and chlomethoxyfen movement in subtropical soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66:1-8.
- Chiu, T. C., J. H. Yen, Y. N. Hsieh and Y. S. Wang. 2005. Reductive transformation of dieldrin under anaerobic sediment culture. *Chemosphere* 60:1182-1189.
- Clark, F. E. and L. W. Durrell. 1965. Algae, p. 1506-1512. *In* C. A. Black et al. (ed.), *Methods of soil analysis*. Am. Soc. of Agron., Inc., Madison, Wis.
- Das, A. C. and A. Debnath. 2006. Effect of systemic herbicides on N_2 -fixing and phosphate solubilizing microorganisms in relation to availability of nitrogen and phosphorus in paddy soils of west Bengal. *Chemosphere* 65:1082-1086.
- Datta, S. and S. Datta. 2006. Evaluation of clustering algorithms for gene expression data. *BMC Bioinformatics* 7(Suppl. 4):S17.
- Ding, Y., J. Wang, Y. Liu and S. Chen. 2005. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *J. Appl. Microbiol.* 99:1271-1281.
- Döbereiner, J., V. L. D. Baldani, F. L. Olivares and V. M. Reis. 1994. Endophytic diazotrophs: The key to graminaceous plants, p. 395-408. *In* N. A. Hegazi, M.

- Fayez and M. Moinib, (ed.), Nitrogen fixation with non-legumes. American University in Cairo Press, Cairo, Egypt.
- Duseja, D. R. and E. E. Holmes. 1978. Field persistence and movement of trifluralin in two soil types. *Soil Sci.* 125:41-48.
- El-Fantroussi, S. 2000. Enrichment and molecular characterization of a bacterial culture that degrades methoxy-methyl urea herbicides and their aniline derivatives. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5110-5115.
- Erwin, G. Z., A. D. L. Akkermans and W. M. de Vos. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3854-3859.
- Fernández-Valiente, E., A. Ucha, A. Quesada, F. Leganés and R. Carreres. 2000. Contribution of N₂ fixing cyanobacteria to rice production: availability of nitrogen from ¹⁵N-labelled cyanobacteria and ammonium sulphate to rice. *Plant Soil* 221:107-112.
- Fischer, H. M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Revs.* 58:352-386.
- Frazzon, J. and I. S. Schrank. 1998. Sequencing and complementation analysis of the *nifUSV* genes from *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 159:151-158.
- Fu, H., and R. H. Burris. 1989. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. *J. Bacteriol.* 171:3168-3175.
- Garbeva, P., J. A. van Veen and J. D. van Elsas. 2003. Predominant *Bacillus* spp. In agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microb. Ecol.* 45:302-316.
- Gelsomino, A., A. C. K. Wolters, G. Cacco and J. D. van Elsas. 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* 38:1-15.
- George, T., J. K. Ladha, R. J. Buresh and D. P. Garrity. 1992. Managing native and legume-fixed nitrogen in lowland rice-based cropping systems. *Plant Soil* 141:69-91.

- Gürtler, V., H. D. Barrie and B. C. Mayall. 2002. Denaturing gradient gel electrophoretic multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates. *Electrophoresis* 19:3310-3320.
- Haahtela, K., T. Wartiovaara, V. Sundman and J. Skujins. 1981. Root-associated N₂ fixation (Acetylene reduction) by *Entereobacteriaceae* and *Azospirillum* strains in cold-climate Spodosol. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:203-206.
- Halleib, C. M. and P. W. Ludden. 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutr.* 130:1081-1084.
- Hang, M., Y. F. Ye, Z. Y. Chen, W. X. Wu and Y. Du. 2001. Effects of butachlor on microbial populations and enzyme activities in paddy soil. *J. Environ. Sci. Health.* 36:581-595.
- Härdle, W. and L. Simar. 2003. Cluster analysis. *In Applied Multivariate Statistical Analysis.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Heuer, H. and K. Smalla. 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities, p 353-357. *In van Elsas, J. D. E. M. H. Wellington and J. T. Trevors (ed.), Modern soil microbiology.* Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y.
- Inoue, K., H. Habe, H. Yamane, T. Omori and H. Nojiri. 2005. Diversity of carbazole-degrading bacteria having the *car* gene cluster: Isolation of a novel gram-positive carbazole-degrading bacterium. *FEMS Microl. Lett.* 245:145-153.
- Irisarri, P., S. Gonnet and J. Monza. 2001. Cyanobacteria in Urugayan rice fields: diversity, nitrogen fixing ability and tolerance to herbicides and combined nitrogen. *J. Biotech.* 91:95-103.
- Jena, P. K., T. K. Adhya and V. R. Rao. 1990. Nitrogen-fixing bacterial populations as influenced by butachlor and thiobencarb in rice soil. *Zentralbl Microbiol.* 145:457-460.
- Klassen, G., F. O. Pedrosa, E. M. Souza, S. Funayama and L. U. Rigo. 1997. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* strain SMR1. *Can. J. Microbiol.* 43:887-891.

- Klassen, G., F. O. Pedrosa, E. M. Souza and L. U. Rigo. 1999. Sequencing and functional analysis of the *nifENXorf 1orf 2* gene cluster of *Herbaspirillum seropedicae*. FEMS Microbiol. Letts. 181:165-170.
- Kundu, D. K. and J. K. Ladha. 1995. Efficient management of soil and biological fixed N₂ in intensively-cultivated rice fields. Soil Biol. Biochem. 27:431-439.
- Kirchhof, G., B. Eckert, M. Stoffels, J. I. Baldani, V. M. Reis and A. Hartmann. 2001. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C₄-fibre plants. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:157-168.
- Lee, F. L., H. P. Kuo, C. J. Tai, A. Yokota and C. C. Lo. 2007. *Paenibacillus taiwanensis* sp. nov., isolated from soil in Taiwan. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:1351-1354.
- Lee, S., A. Reth, D. Meletzus, M. Sevilla and C. Kennedy. 2001. Characterization of a major cluster of *nif*, *fix* and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. J. Bacteriol. 182:7088-7091.
- Lee, T. H., S. Kurata, C. H. Nakatsu and Y. Kamagata. 2005. Molecular analysis of bacterial community based on 16S rDNA and functional genes in activated sludge enriched with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) under different cultural conditions. Microbiol. Ecol. 49:151-162.
- Lewis, R. J., R. C. Prince, P. L. Dutton, D. B. Knaff and T. A. Krulwich. 1981. The respiratory chain of *Bacillus alcalophilus* and its nonalkalophilic mutant derivative. J. Biol. Chem. 25:10543-10549.
- Liu, Z., H. Yang, Z. Huang, P. Zhou and S. J. Liu. 2002. Degradation of aniline by newly isolated extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58:679-682.
- Lucas García, J. A., A. Probanza, B. Ramos, J. Barriuso and F. J. Gutierrez Mañero. 2004. Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) and *Sinorhizobium fredii* on biological nitrogen fixation, nodulation and growth of *Glycine max* cv. Osumi. Plant Soil 267:143-153.
- Macur, R. E., J. T. Wheeler, M. D. Burr and W. P. Inskeep. 2007. Impacts of

- 2,4-D application on soil microbial community structure and on populations associated with 2,4-D degradation. *Microbiol Res.* 162:37-45.
- Mark, K. A. and E. T. Craswell. 1992. Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant Soil* 141:13-39.
- Matolcsy, G., M. Nádasy and V. Andriska. 1988. *Pesticide Chemistry*. Elsevier, Science Publishing Co., Inc.
- Merrick, C. J. 1993. Organization and regulation of nitrogen fixation genes, p. 1-12. *In* R. Palacios, J. Mora and W. E. Newton (eds.), *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Nijhoff Publishers, The Netherlands.
- Michener, C. D. and R. R. Sokal. 1957. A quantitative approach to a problem in classification. *Evolution* 11:130-162.
- Min, H., Y. F. Ye, Z. Y. Chen, W. X. Wu and D. Yufeng. 2001. Effects of butachlor on microbial populations and enzyme activities in paddy soil. *J. Environ. Sci. Health.* 36:581-595.
- Mishra, A. K. and A. B. Pandey. 1989. Toxicity of three herbicides to some nitrogen-fixing cyanobacteria. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 17:236-246.
- Moore, A. W. 1966. Non symbiotic nitrogen fixation in soil and soil-plant systems. *Soils Fertil.* 29:113-128.
- Muyzer, G., E. C. DeWall and A. G. Uitterlinden. 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.
- Muyzer, G. and K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:127-141.
- Nayak, D. N., I. C. Pasalu and V. R. Rao. 1980. Influence of natural and synthetic pesticides on nitrogen fixation (C_2H_2 reduction) in the rice rhizosphere. *Curr. Sci.* 49:118-119.
- Nielsen, L. W. and I. Dahllöf. 2007. Direct and indirect effects of the herbicides Glyphosate, Bentazone and MCPA on eelgrass (*Zostera marian*). *Aquat.*

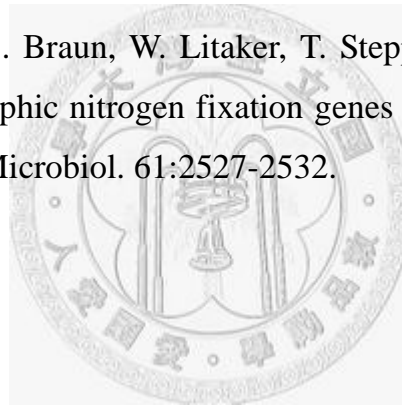
- toxicol. 82:47-54.
- Pal, R., P. Das, K. Chakrabarti, A. Chakraborty and A. Chowdhury. 2006. Butachlor degradation in tropical soils: effect of application rate, biotic-abiotic interactions and soil conditions. *J. Environ. Sci. Health B* 41:1103-1113.
- Patnaik, G. K., P. K. Kanungo, B. T. S. Moorthy, P. K. Mahana, T. K. Adhya and V. R. Rao. 1995. Effect of herbicides on nitrogen fixation (C_2H_2 reduction) associated with rice rhizosphere. *Chemosphere* 30:339-343.
- Paulsen, I. T., R. Seshadri, K. E. Nelson, J. A. Eisen, J. F. Heidelberg, T. D. Read, R. J. Dodson, L. Umayam, L. M. Brinkac, M. J. Beanan, S. C. Daugherty, R. T. Deboy, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, W. C. Nelson, B. Ayodeji, M. Kraul, J. Shetty, J. Malek, S. E. Van Aken, S. Riedmuller, H. Tettelin, S. R. Gill, O. White, S. L. Salzberg, D. L. Hoover, L. E. Lindler, S. M. Halling, S. M. Boyle, C. M. Fraser. 2002. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Genome Res.* 99:13148-13153.
- Pedrosa, F. O., K. R. S. Teixeira, I. M. P. Machado, M. B. R. Steffens, G. Klessen, E. M. Benelli, H. B. Machado, S. Funayama, L. U. Rigo, M. L. Ishida, M. G. Yates and E. M. Souza. 1997. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. *Soil Biol. Biochem.* 29:843-846.
- Pettersson, B., K. E. Rippere, A. A. Yousten and F. G. Priest. 1999. Transfer of *Bacillus lentimorbus* and *Bacillus popilliae* to the genus *Paenibacillus* with emended description of *Paenibacillus lentimorbus* comb. nov, and *Paenibacillus popilliae* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:531-540.
- Poly, F., L. Ranjard, S. Nazaret, F. Gourbière and L. J. Monrozier. 2001. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2255–2262.
- Quesada, A., F. Leganés and E. Fernández-Valiente. 1997. Environmental factors controlling N_2 fixation in Mediterranean rice fields. *Microbiol. Ecol.* 34:39-48.
- Rao, J. L. N., I. C. Pasalu and V. Rajaramamohan Rao. 1983. Nitrogen fixation

- (C₂H₂ reduction) in the rice rhizosphere soil as influenced by pesticides and methods of their application. *J. Agric. Sci. Camb.* 100:637-642.
- Rösch, C., A. Mergel and H. Bothe. 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3818-3829.
- Rosodo, S. A., G. F. Duarte, L. Seldin and J. D. V. Elsas. 1998. Genetic diversity of *nifH* gene sequence in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2770-2779.
- Ruijssenaars, H. J., J. A. M. de Bont and S. Hartmans. 1999. A pyruvated mannose-specific xanthan lyase involved in xanthan degradation by *Paenibacillus alginolyticus* XL-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2446-2452.
- Schlöter, M., M. Leubner, T. Heulin and A. Hartmann. 2000. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:647-660.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler and D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticide crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.
- Selvakumar, G., G. Gopalaswamy and S. Kannaiyan. 2002. Pigment analysis and ammonia excretion in herbicide tolerant cyanobacteria. *Indian J. Exp. Biol.* 40:934-940.
- Shi, S. and G. D. Bending. 2007. Changes to the structure of *Sphingomonas* spp. communities associated with biodegradation of the herbicide isoproturon in soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 269:110-116.
- Singh, M., A. Kleeberger and W. Klingmüller. 1983. Location of nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous plasmids of *Enterobacter agglomerans*. *Mol. Gen. Genet.* 190:373-378.
- Singh, S. P. and K. G. Pillsi. 1993. Weed control in direct seeded rice under puddle conditions. *Indian J. Plant Protect.* 21:224-227.
- Smirnov, A. M. 1976. Disinfection of the soil of apiaries infected with the bacteria of bee diseases. *Veterinariya (Moscow)* 6:32-37.

- Smyk, B. and Ettlinger, L. 1963. Research on various species of nitrogen-fixing *Arthrobacter* isolated from karstic alpine rocks. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 105:341-348.
- Sokolova, I. E., T. P. Kylochek and A. I. Vinnikov. 2004. A biosynthesis activity of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*. *Mikrobiol. Z.* 66:10-17.
- Song, T., L. Mårtensson, T. Eriksson, W. Zheng and U. Rasmussen. 2005. Biodiversity and seasonal variation of the cyanobacterial assemblage in a rice paddy field in Fujian, China. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54:131– 140.
- Souza, E. M., S. Funayama, L. U. Rigo, M. G. Yates and F. O. Pedrosa. 1991. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. *J. Gen. Microbiol.* 137:1511-1522.
- Souza, E. M., F. O. Pedrosa, M. Drummond, L. U. Rigo and M. G. Yates. 1999. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. *J. Bacteriol.* 181:681-684.
- Steenhoudt, O. and J. Vanderleyden. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Revs.* 24:487-506.
- Stumpf, F., L. Halda and W. Klingmüller. 1993. pMH2, a small plasmid bearing the *nif* gene cluster of *Enterobacter agglomerans* 333 as an excisable cassette. *Mol. Gen. Genet.* 241:236-240.
- Suseela, M. R. 2001. Effect of butachlor on growth and nitrogen fixation by *Anabaena sphaerica*. *J. Environ. Biol.* 22:201-203.
- Tate, R. L. 1995. Nitrogen fixation: The gateway to soil nitrogen cycling, p. 287. *In Soil microbiology*. John Wiley & Sons, Inc. N. Y.
- Tilak, K. V. B. R. and B. Srinivasa. Reddy. 2006. *Bacillus cereus* and *B. circulans* – novel inoculants for crops. *Curr. Sci.* 90:642-644.
- Tomlin, C. D. S. 2003. *In The pesticide manual*, 13th ed. British Crop Protection Council, UK.
- Topp, E., H. Zhu, S. M. Nour, S. H. M. Lewis and D. Cuppels. 2000a. Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. Isolated

- from Canadian and fresh agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2773-2782.
- Topp, E., W. M. Mulbry, H. Zhu, S. M. Nour and D. Cuppels. 2000b. Characterization of S-Triazine herbicide metabolism by a *Nocardiodies* sp. isolated from agricultural Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3134-3141.
- Tsumura, W. 1994. Identification and characteristics of organic compounds in tap water trapped by membrane of microporous polyethylene hollow fibers. *J. Toxicol. Environ. Health* 40:244-251.
- Ueda, T., Y. Suga, N. Yashiro and T. Matsuguchi. 1995. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J. Bacteriol.* 177:1414-1417.
- Valle, A., G. Boschini, M. Negri, P. Abbruscato, C. Sorlini, A. D'Agostina and E. Zanardini. 2006. The microbial degradation of azimsulfuron and its effect on the soil bacterial community. *J. Appl. Microbiol.* 101:443-452.
- Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters and J. Swings. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60:407-438.
- Vanechoutte, M. 1996. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. *Mol. Biotechnol.* 6:115-142.
- Wang, Y. S., C. Y. Wen, T. C. Chiu and J. H. Yen. 2004. Effects of fungicide iprodione on soil bacterial community. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59:127-132.
- Wang, Y. S., J. C. Liu, W. C. Chen and J. H. Yen. 2008. Characterization of Acetanilide Herbicides Degrading Bacteria Isolated from Tea Garden Soil. *Microb. Ecol.* 55:435-443.
- Wassem, R., E. M. Souza, M. G. Yates, F. O. Pedrosa and M. Buck. 2000. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. *Mol. Microbiol.* 35:756-764.
- Watanabe, A., S. Nishigaki and C. Konishi. 1951. Effect of nitrogen fixing blue-green algae on the growth of rice plants. *Nature* 168:748-749.
- Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt,

- M. P. Starr and H. G. Trüper. 1987. Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:463-464.
- Xu, D., Z. Xu, S. Zhu, Y. Cao, Y. Wang, X. Du, Q. Gu and F. Li. 2005. Adsorption behavior of herbicide butachlor on typical soils in China and humic acids from the soil samples. *J. Colloid Interface Sci.* 285:27-32.
- Young, J. P. W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing bacteria, p. 43-53. *In* G. Stacey, R. H. Burris and H. J. Evans (eds.), *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman & Hall, New York.
- Yu, Y. L., Y. X. Chen, Y. M. Luo, X. D. Pan Y. F. He and M. H. Wong. 2003. Rapid degradation of butachlor in wheat rhizosphere soil. *Chemosphere* 50:771-774.
- Zehr, J. P., M. Mellon, S. Braun, W. Litaker, T. Steppe and H. W. Paerl. 1995. Diversity of heterotrophic nitrogen fixation genes in a marine cyanobacterial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2527-2532.



附錄

附錄 A 水稻種植第 7 天時所篩選出具固氮潛力之可培養性菌

Appendix A. Isolated potential free-living nitrogen-fixation bacteria in this study after 7 days of rice cultivation

Treatment	Number	Species	Accession number	Title	Identiy (%)
Control, upper layer	3	<i>Janthinobacterium</i> sp.	AB196254	Diversity of carbazole-degrading bacteria having the car gene cluster: isolation of a novel gram-positive carbazole-degrading	99
	6	<i>Bacillus</i> sp.	EU196519	Population diversity of rhizosphere bacteria from golden pear	98
	10	<i>Micrococcaceae</i> bacterium	EU370704	<i>Chinbacter flavus</i> gen. nov., sp. nov, isolated from forest soil	100
	11	<i>Streptomyces</i> sp.	AY999089	Identification and molecular sequencing of <i>Streptomyces</i> sp. 4017 isolated from <i>Fabaceae</i> (<i>Colutea arborescens</i> L.) Rhizosphere Soil in Turkey	97
	12	Bacterium	EU249930	Degradation of polychlorinated biphenyl (PCB) by a consortium obtained from a contaminated soil composed by <i>Brevibacterium</i> , <i>Pandoraea</i> and <i>Ochrobactrum</i> members	96
Control, lower layer	1	<i>Paenibacillus</i> sp.	AM162350	Polyphasic characterization of <i>Paenibacillus</i> spp. isolated from various habitats of Korea	99
	5	<i>Bacillus</i> sp.	EU196519	Population diversity of rhizospherebacteria from golden pear	98
	6	Uncultured forest soil bacterium	AY913510	Bacterial diversity of a German forest soil, as assessed by nifH, nosZ, and SSU clone libraries and tRFLP	94
	8	<i>Paenibacillus agarexedens</i>	EU240421	Culturable bacteria diversity of <i>Phyllostachys pubescens</i> rhizosphere	99

	9	<i>Arthrobacter</i> sp.	EU439407	microbial degradation of decabromodiphenyl ether (BDE-209)	99
	12	<i>Streptomyces</i> sp.	AY999089	Identification and molecular sequencing of <i>Streptomyces</i> sp. 4017 isolated from <i>Fabaceae</i> (<i>Colutea arborescens</i> L.) rhizosphere soil in Turkey	98
15 g are ⁻¹ , upper layer	1	<i>Janthinobacterium</i> sp.	AB196254	Diversity of carbazole-degrading bacteria having the car gene cluster: isolation of a novel gram-positive carbazole-degrading	99
15 g are ⁻¹ , lower layer	1	<i>Arthrobacter</i> sp.	AB248532	Direct Submission	92
	2	<i>Arthrobacter</i> sp.	EU196467	Direct Submission	99
	3	<i>Arthrobacter</i> sp.	AF197029	Phylogenetic and physiological diversity of <i>Arthrobacter</i> strains isolated from unconsolidated subsurface sediments	98
	4	<i>Arthrobacter</i> sp.	EU034524	Identification of plant growth-promoting bacteria and their potential application in the phytostabilization of mine tailings	99
	7	<i>Arthrobacter globiformis</i>	EU221373	Diversity of <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> species and diazotrophs population in the rhizosphere of wheat and their plant growth promoting properties	99
	8	<i>Arthrobacter</i> sp.	DQ519082	A diversity bacteria community in PAHs-contaminated soil	100
	11	<i>Arthrobacter</i> sp.	EU182842	Phylogenetic diversity of the cultivable bacterial community associated with the soil fungistasis	97

附錄 B. 水稻種植第 39 天時所篩選出具固氮潛力之可培養性菌

Appendix B. Isolated potential free-living nitrogen-fixation bacteria in this study after 39 days of rice cultivation

Treatment	Assigned number	Species	Accession number	Title	Identiy (%)	
Control, upper layer	1	<i>Herbaspirillum putei</i>	EU046556	Reclassification of <i>Herbaspirillum putei</i> as a synonym of <i>Herbaspirillum huttiense</i> and proposal of subspecies <i>Herbaspirillum huttiense</i> subsp. <i>huttiense</i> subsp. nov. and <i>Herbaspirillum huttiense</i> subsp. <i>putei</i> subsp. nov., comb. nov.	99	
	2	<i>Pseudomonas</i> sp.	DQ084547	N-acyl homoserine lactone quorum sensing in rice rhizosphere <i>Pseudomonas</i> spp.	100	
	3	<i>Enterobacter</i> sp.	EU240960	Direct Submission	100	
	4	<i>Roseateles</i> sp.	AB013425	Phylogenetic affiliation of soil bacteria that degrade aliphatic polyesters available commercially as biodegradable plastics	99	
	6	<i>Rhizobium</i> sp.	DQ454118	Direct Submission	98	
	8	<i>Xanthomonas</i> sp.	DQ011535	Direct Submission	99	
	Control, lower layer	1	<i>Duganella nigrescens</i>	EF584756	<i>Duganella nigrescens</i> sp. nov., a new member of the family <i>Oxalobacteraceae</i> isolated from Qinghai, north-west China	97
		2	<i>Azospirillum</i> sp.	AB049112	Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a <i>Herbaspirillum</i> sp. isolated from wild rice species	97
3		<i>Arthrobacter</i> sp.	AB248532	Studies on some gram-positive bacteria isolated from soil	99	
4		<i>Azospirillum oryzae</i>	AB185396	<i>Azospirillum oryzae</i> sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant <i>Oryza sativa</i>	99	

	5	<i>Brucella suis</i>	CP000912	<i>Brucella suis</i> ATCC 23445 whole genome shotgun sequencing project	97
15 g are ⁻¹ , upper layer	1	<i>Roseateles</i> sp.	AB013425	Phylogenetic affiliation of soil bacteria that degrade aliphatic polyesters available commercially as biodegradable plastics	99
	2	<i>Arthrobacter</i> sp.	AB248532	Studies on some Gram-positive bacteria isolated from soil	99
	5	<i>Rhizobium</i> sp.	EF540509	Impact of phytoremediation on the community structure of semi-coke, the solid waste from oil-shale chemical industry	98
	6	<i>Streptomyces recifensis</i>	EU216596	Selective nitroreduction of nitroaromatic compounds	100
	7	<i>Bacillus megaterium</i>	EF690396	Direct Submission	99
15 g are ⁻¹ , lower layer	1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AY364329	Screening of dibenzothiophene-degrading bacterium <i>Agrobacterium tumefaciens</i> UP-3	98
	2	<i>Pseudomonas</i> sp.	DQ847126	A strain degrading fenvalerate	99
	3	<i>Brucella suis</i>	CP000912	<i>Brucella suis</i> ATCC 23445 whole genome shotgun sequencing project	96
	4	<i>Bacillus</i> sp.	EU368773	Phylogenetic analysis of bacterial communities	99
	6	<i>Roseateles</i> sp.	AB013425	Phylogenetic affiliation of soil bacteria that degrade aliphatic polyesters available commercially as biodegradable plastics	99
	7	<i>Bacillus</i> sp.	AY373362	Identification and determination of nitrogen-fixing bacillus	100
	9	<i>Azospirillum doebereineriae</i>	AJ238567	<i>Azospirillum doebereineriae</i> sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass <i>Miscanthus</i>	95
	10	<i>Bacillus</i> sp.	EU373361	Endophytic bacterial communities in Chinese cabbage and their antimicrobial activity against pathogens	99

附錄 C. 水稻種植第 7 天時所篩選出之可培養性菌

Appendix C. Isolated bacteria in this study after 7 days of rice cultivation

Treatment	Assigned number	Species	Accession number	Title	Identiy (%)	
Control, upper layer	1	<i>Bacillus</i> sp.	DQ993309	Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis	99	
	2	<i>Bacillus</i> sp.	EF690416	Plant growth promoting rhizobacteria	100	
	3	<i>Bacillus megaterium</i>	EU221410	Diversity of <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> species and diazotrophs population in the rhizosphere of wheat and their plant growth promoting properties	94	
	4	<i>Bacillus</i> sp.	EU170129	Isolation and identification of halotolerant Bacteria	93	
	5	<i>Bacillus</i> sp.	EU196519	Population diversity of rhizosphere bacteria from golden pear	94	
	6	<i>Paenibacillus elgii</i>	AY090110	<i>Paenibacillus elgii</i> sp. nov., with broad antimicrobial activity	93	
	7	<i>Janthinobacterium</i> sp.	AB196254	Diversity of carbazole-degrading bacteria having the car gene cluster: isolation of a novel gram-positive carbazole-degrading bacterium	99	
	8	<i>Bacillus</i> sp.	DQ508485	<i>Bacillus</i> sp., a novel bacterium	93	
	9	<i>Paenibacillus</i> sp.	AY571846	Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica	94	
	11	<i>Bacillus senegalensis</i>	AF519468	Characterization of six new species of denitrifying <i>Bacillus</i> from tropical rice soils	94	
	14	<i>Bacillus cereus</i>	EU187485	Isolation and characterization of quinoline degrading bacteria from wastewater denitrifying bioreactors	98	
	Control, lower layer	1	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	AY509232	Molecular characterization and identification of nickel resistance soil bacteria in the rhizosphere of <i>Alyssum murale</i>	98

	2	<i>Bacillus cereus</i>	EF100618	Denitrification bacterium	99
	3	<i>Bacillus flexus</i>	EU221413	Diversity of <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> species and diazotrophs population in the rhizosphere of wheat and their plant growth promoting properties	99
	5	<i>Bacillus</i> sp.	DQ993309	Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis	99
	7	<i>Bacillus</i> sp.	DQ084547	Fate of nitrogenous nutrient and denitrifier in sediment profiles of Tanshui River estuary	99
	8	<i>Bacillus</i> sp.	AY289497	Development and application of a selective PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to detect a recently cultivated bacillus group predominant in soil	99
	9	<i>Bacilli</i> bacterium	EF191186	Oil removal in media with proteo-chitinous wastes, by hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-polluted soils	100
	10	<i>Paenibacillus</i> sp.	EU179327	<i>Paenibacillus</i> sp. BCRC 17757, a bacterium isolated from soil in Taiwan	98
	11	<i>Bacillus</i> sp.	EU531552	Plant growth promoting rhizobacteria	99
	12	<i>Bacillus niacini</i>	AF468221	Direct Submission	99
15 g are ⁻¹ , upper layer	1	<i>Bacillus niacini</i>	AF468221	Direct Submission	99
	2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	EU625359	16S rRNA sequence of a non-toxic indigenous <i>Bacillus thuringiensis</i> isolate of Madurai district, Tamil Nadu, India	100
	3	<i>Bacillus circulans</i>	AB215100	Reclassification of <i>Gluconacetobacter hansenii</i> strains and proposals of <i>Gluconacetobacter saccharivorans</i> sp. nov. and <i>Gluconacetobacter nataicola</i> sp. nov	99
	4	<i>Bacillus</i> sp.	AB183800	The number and diversity of spore-forming bacteria in Japanese soils and their potential as biological control agents	100

	5	<i>Bacillus</i> sp.	EU182875	Phylogenetic diversity of the cultivable bacterial community associated with the soil fungistasis	99
	6	<i>Telluria mixta</i>	AF297697	Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments	99
	7	<i>Bacillus alcalophilus</i>	EU531567	Plant growth promoting rhizobacteria	99
	8	<i>Bacillus</i> sp.	EU070359	Phylogenetic analysis of bacterial communities	99
	9	<i>Bacillus</i> sp.	EU070402	Phylogenetic analysis of bacterial communities	99
	10	<i>Bacillus</i> sp.	AM934693	Major influence of forest soil communities on the cultured aerobic heterotrophic bacteria in rivulet water and tufa biofilm as exemplified by bacterial diversity	99
	11	<i>Paenibacillus alvei</i>	AJ320491	<i>Paenibacillus stellifer</i> sp. nov., a cyclodextrin producing species isolated from paperboard	99
15 g are ⁻¹ , lower layer	1	<i>Bacillus alcalophilus</i>	EU531567	Plant growth promoting rhizobacteria	99
	2	<i>Arthrobacter</i> sp.	EU182842	Phylogenetic diversity of the cultivable bacterial community associated with the soil fungistasis	98
	3	<i>Bacillus niacini</i>	AF468221	Direct Submission	100
	4	<i>Bacillus</i> sp.	EU182875	Phylogenetic diversity of the cultivable bacterial community associated with the soil fungistasis	99
	7	<i>Bacillaceae</i> bacterium	AF513456	The Hawaiian Archipelago: a microbial diversity hotspot	99
	8	<i>Bacillus</i> sp.	EU070402	Phylogenetic analysis of bacterial communities	99
	9	<i>Bacillus</i> sp.	EU070359	Phylogenetic analysis of bacterial communities	99
	10	<i>Bacillus</i> sp.	DQ167242	Direct Submission	100
	11	<i>Bacillus</i> sp.	EU571195	Microbial community composition in Brazilian anthrosols and adjacent soils	99



附錄 D. 水稻種植第 39 天時所篩選出之可培養性菌

Appendix D. Isolated bacteria in this study after 39 days of rice cultivation

Treatment	Assigned number	Species	Accession number	Title	Identiy (%)
Control, upper layer	1	<i>Herbaspirillum putei</i>	EU046556	Reclassification of <i>Herbaspirillum putei</i> as a synonym of <i>Herbaspirillum huttiense</i> and proposal of subspecies <i>Herbaspirillum huttiense</i> subsp. <i>huttiense</i> subsp. nov. and <i>Herbaspirillum huttiense</i> subsp. <i>putei</i> subsp. nov., comb. nov.	99
	2	<i>Bacillus</i> sp.	DQ084547	Fate of nitrogenous nutrient and denitrifier in sediment profiles of Tanshui River estuary	99
	3	<i>Roseateles</i> sp.	AB013425	Phylogenetic affiliation of soil bacteria that degrade aliphatic polyesters available commercially as biodegradable plastics	98
	4	<i>Pseudomonas</i> sp.	AM911653	N-acyl homoserine lactone quorum sensing in rice rhizosphere <i>Pseudomonas</i> spp.	99
	6	<i>Paenibacillus taiwanensis</i> sp. nov., isolated from soil in Taiwan	DQ890521	<i>Paenibacillus taiwanensis</i> sp. nov., isolated from soil in Taiwan	96
	7	<i>Bacillus</i> sp.	EU439416	Microbial degradation of decabromodiphenyl ether (BDE-209)	99
	Control, lower layer	1	<i>Bacillus</i> sp.	EU196519	Population diversity of rhizosphere bacteria from golden pear
2		<i>Bacillus</i> sp.	EF694706	Plant growth promoting rhizobacteria	99

	3	<i>Arthrobacter globiformis</i>	EU221373	Diversity of <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> species and diazotrophs population in the rhizosphere of wheat and their plant growth promoting properties	99
	4	<i>Arthrobacter</i> sp.	AB248528	Studies on some gram-positive bacteria isolated from soil	99
	5				
	6	<i>Bacillus</i> sp.	EU439416	Microbial degradation of decabromodiphenyl ether (BDE-209)	100
	7	<i>Arthrobacter</i> sp.	AB248532	Studies on some gram-positive bacteria isolated from soil	99
	8	<i>Bacillus niacini</i>	AF468221	Direct Submission	99
15 g are ⁻¹ , upper layer	1	<i>Pseudomonas</i> sp.	EU167991	Enrichment, isolation, and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Elizabeth River sediments	99
	2	<i>Bacillus niacini</i>	AF468221	Direct Submission	99
	3	<i>Bacillus</i> sp.	EU417653	The study of prokaryotic diversity of a landfill environment using a polyphasic taxonomic approach	99
	4	<i>Chryseobacterium</i> sp.	EU109723	Direct Submission	97
	5	<i>Acidovorax</i> sp.	EU375646	The diversity of bacteria degrading various organic pollutants	98
	6	<i>Bacillus</i> sp.	AM934689	Major influence of forest soil communities on the cultured aerobic heterotrophic bacteria in rivulet water and tufa biofilm as exemplified by flavobacterial	98

			diversity		
	7	<i>Bacillus flexus</i>	EU430098	Isolation and biosorption performance of several strains of copper-resistant bacteria	99
	9	<i>Roseateles</i> sp.	AB013425	Phylogenetic affiliation of soil bacteria that degrade aliphatic polyesters available commercially as biodegradable plastics	99
	11	<i>Bacillus thuringiensis</i>	EF495116	<i>Bacillus thuringiensis</i> aizawai from Iran	99
15 g are ⁻¹ , lower layer	1	<i>Acidovorax</i> sp.	EU375646	The diversity of bacteria degrading various organic pollutants	99
	2	<i>Bacillus</i> sp.	DQ416786	Phylogenetic delineation of chromate-resistant bacteria and 16S rDNA clones retrieved from Cr(VI) contaminated sediments	99
	3	<i>Bacillus</i> sp.	EF694706	Plant growth promoting rhizobacteria	99
	4	<i>Paenibacillus alginolyticus</i>	AB073362	Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus <i>Paenibacillus</i>	98
	5	<i>Arthrobacter</i> sp.	EU034524	Identification of plant growth-promoting bacteria and their potential application in the phytostabilization of mine tailings	99
	6	<i>Bacillus megaterium</i>	EU256401	The diversity of PGPR from mangrove forest in South China	99
	8	<i>Bacillus thuringiensis</i>	EF495116	<i>Bacillus thuringiensis</i> aizawai from Iran	99
