

太魯閣國家公園石灰華區內 微生物遺傳多樣性之研究

內政部營建署太魯閣國家公園管理處委託研究報告
中華民國九十三年十二月

太魯閣國家公園石灰華區內 微生物遺傳多樣性之研究

受委託者：國立台灣大學園藝學系

研究主持人：徐源泰 教授

內政部營建署太魯閣國家公園管理處委託研究報告
中華民國九十三年十二月

目次

表次	3
圖次	4
摘要	5
第一章、緒論	8
一、研究緣起與背景.....		8
二、石灰岩和石灰華之形成.....		8
三、生物多樣性之重要性和指標.....		10
1. 生物多樣性之定義.....		11
2. 生物多樣性之指標.....		12
四、本研究之未來應用潛力.....		13
第二章、材料與方法	14
第三章、結果與討論	17
第四章、總結與建議	39
第五章、謝誌	40
參考文獻	40

表 次

表一 石灰華採樣地點紀錄表.....	20
表二 三種石灰華樣品 Clone libraries 之個數.....	26
表三 三種石灰華之多樣性指標.....	29
表四 三種石灰華樣品菌種之分佈.....	30
表五 採樣地點之微生物屬名.....	31

圖 次

圖一 採樣地點位置示意圖	19
圖二 長春祠瀑布型石灰華 (A); 石灰華表面石灰結晶 (B)	21
圖三 白楊步道外 (168 Km) 波狀石灰華 (A); 石灰華橫切面 (B) ...	22
圖四 燕子口隧道變電箱旁結晶中之石灰華 (A); 石灰華表面石灰結晶 (B)	23
圖五 三種石灰華 16S rDNA clones 之 11 分群間關係.....	25
圖六 三種石灰華的豐富度曲線.....	28
圖七 三種石灰華中各群微生物含量	33
圖八 採樣點之微生物分佈，以光合細菌 <i>Arthrospira sp.</i> 和 <i>Symphyonemopsis</i> 佔最多.....	34
圖九 以細菌族群分類三種石灰華環境樹狀圖	35
圖十 採樣地點之螢光原位雜交。白楊散步道 (A,B)、燕子口 (C,D) 和長春祠 (E,F) 分別以 Cyan785 和 Proteobac 標定紅色 (Cy5) 和綠色螢光 (Cy3)	37

摘要

關鍵詞: 石灰華、微生物、多樣性、環境指標

一、研究緣起

太魯閣國家公園含有許多峭壁、斷崖、峽谷、山洞隧道、大理岩層和溪流等，蘊藏極為豐富之生物資源。其中，最富具特色為由石灰岩的石灰華 (travertine 或 tufa)。在石灰華樣本之斷面上發現有許多附著物，其上有微生物包圍生存。因為石灰華為鹼性之環境，生長在其中為好鹼性微生物，具有保育、教育與利用開發等之價值。因此計畫在太魯閣峽谷中石灰岩地帶採集石灰華樣本，分析其微生物之多樣性。調查之結果不但可以了解太魯閣峽谷中石灰岩地帶石灰華中之微生物分布，比對好鹼性微生物的種類，當作未來開發之參考；更可以記錄其微生物多樣性，做為未來環境變化的指標。

二、研究方法及過程

採用 TA cloning、定序和螢光原位雜交的方法探討本區域之石灰華微生物多樣性。在太魯閣峽谷內三個地點採石灰華樣品，分別為長春祠、白楊步道外(中橫 168 K 標示處，洞內)及燕子口隧道變電箱旁。

三、重要發現

長春祠之石灰華樣品表面上有大型的藻類附著，且有不連續的大小的孔隙狀構造，於附著物上有許多不足 10 微米大小的方解石 (calcite) 結晶，其上有藍菌包圍生存。三種石灰華樣品中，並無因著生於石灰華表層之生物，進行光合作用時，大量參與化學反應過程所產生條紋狀構造存在。三種石灰華樣品之微生物多樣性分析，結果為長春祠、白楊步道外(中橫 168 Km 標示處，洞內)及燕子口隧道變電箱旁三者之多樣性分別為 0.808、0.864、0.866；均勻度為 0.768，0.9，0.916。分析三種石灰華樣品之微生物菌相分佈和含量，結果發現，Cyanobacteria 在石灰華之微生物中佔有最大之比例；第二多的微生物則是 Proteobacteria。依據各種石灰華樣品不同的微生物菌相分佈結果，將三種石灰華分類，

可看出長春祠的石灰華樣品之微生物組成差異性最大。白楊步道外168 Km和燕子口三種石灰華樣品之微生物菌相較相似。

四、主要建議事項

本研究之顯著性和建議如下：

1. 調查之結果，可充實太魯閣國家公園現有除動植物外之微生物遺傳資源，使生物相之了解可更形完成。
2. 可以了解太魯閣峽谷中石灰岩地帶石灰華中之微生物分布，比對好鹼性微生物的種類，使我國遺傳資源之掌握更清晰，做為未來實踐保育利用分享之生物多樣性目標之基礎。
3. 以遺傳多樣性為指標，長期監測記錄其微生物多樣性之變遷，做為未來環境變化的指標與開發限制的依據。

Abstract

Keywords: tufa, microorganism, diversity, environmental indicator

Taroko National Park is a spectacular park with a lot of geographical, historical natural cliffs, valley, tunnels, tufa sediments, river and attracting scenes. The fauna and flora resources in this park are found to be opulent and diversified. Among these, tufa, a kind of limestone sediment was found to be rich in alkaliphilic microorganism on its surface. This study investigated the diversity and component of the microorganism found in tufa sediment by TA cloning, sequencing and fluorescent *in situ* hybridization. Three sampling sites were selected in the Park and the results indicated that the diversity index of sampling sites Chang Chun Temple, Bai Yang walkway and Swallow valley entrance are 0.808, 0.864, 0.866, respectively, and evenness index are 0.768, 0.9, 0.916, respectively. Cyanobacteria and proteobacteria are the two major components of the microbes investigated. The changes and variation of the component of microbes on tufa sediment may serve as an environmental indicator of the Taroko National Park' changing environment.

第一章、緒論

第一節、研究緣起與背景

太魯閣國家公園自日據時代民國 26 年即已開始規劃，歷經太平洋戰爭因而作業停擺。戰後最初由內政部民政司接手規劃，後由內政部營建署統合，核定立霧溪大理岩峽谷、清水斷崖、清水山、南湖大山、合歡群山、奇萊連峰等區域為太魯閣國家公園預定地，地處花蓮、台中及南投三縣的交界處，南北長 36 公里，東西寬 42 公里，面積共 9 萬 2 千餘公頃，含括之區域海拔落差高達 3700 餘公尺，生態保育區佔總面積之 70% (楊，2004)。

於本公園之峭壁、斷崖、峽谷、山洞隧道、大理岩層和溪流蘊藏極為豐富之動植物資源。其中，最富具特色為由石灰岩的石灰華 (travertine 或 tufa)。其中含有相當豐富的微生物遺傳基因資源。台灣近十年來陸續進行野生動植物、微生物及真菌類的遺傳研究，如種原收集、基因庫及種原庫的設立、基因遺傳研究等工作，尤其在微生物及真菌類之分子鑑定與遺傳分析研究上，尚有許多成長的空間。此外，遺傳多樣性的研究亦是生物種之鑑定及分類的重要依據，如物種親緣關係之基因研究、生物進化及演化之探討、生物對環境之適應研究等。由於有關遺傳資源的研究起步較晚，未來還是有很大的發展空間。有關生物多樣性研究，現已成為國際間主要民生與科技發展議題。生物多樣性公約所提倡之三大精神中，除強調傳統保育外，更重視與鼓勵生物多樣性資源之永續利用，及所衍生利益之公平合理分享。由於我國地理與地形環境之優越，所蘊藏之生物多樣性資源也極為豐富。在過去數年的研究中，我們已發現並證實台灣多處特殊極端環境中，如溫熱泉與冷泉，硫磺礦、沼澤與高鹽地、及高度工業污染土壤等，都存在有許多豐富與多樣的微生物。因此，佔極大保育區面積比例的太魯閣國家公園，可作為研究微生物多樣性的極佳地點。以此建立之基礎研究，對微生物的多樣性開發利用，不但易兼顧環境生態與產業發展的而達到理想的永續平衡，亦可提高產業開發價值，未來在科技層次上建立微生物多樣性評估性的預警模式，有更高層次之突破。

第二節、石灰岩和石灰華之形成

台灣石灰岩的分布，依時代的新舊可分為 (1) 現代海岸隆起之珊瑚礁；(2) 近代—上新世舊期珊瑚石灰岩；(3) 台北縣、新竹縣與東部海岸山脈之中新世石灰岩；(4) 始新世—第三紀早期的結晶石灰岩；與 (5) 中央山脈大南澳雜岩之大理岩。中央山脈深灰黑色板岩和千枚岩，夾雜著一些薄層到中層暗灰色至白灰色石英岩、變質砂岩和石灰質或泥灰質凸鏡體或結晶石灰岩地層。在 1996 年，吉村和久等人在中央山脈太魯閣峽谷中之石灰岩地帶進行調查時，首次在幾個地點確認有石灰華之存在，而且在石灰華樣本之斷面上發現有許多附著物，且有不連續的大小不一的孔隙狀構造；於附著物上有許多不足 10 微米大小的方解石結晶，其上有微生物包圍生存 (吉村和久等人, 1996)。

太魯閣內地形險峻，乃因七、八千萬年前之珊瑚礁生物於地底形成石灰岩 (碳酸鈣的沉積岩)，經過高溫與高壓質變為大理岩、再經過南澳造山運動，菲律賓海洋板塊與歐亞大陸板塊碰撞隆起，再經由風化和溪流長期侵蝕作用形成。石灰岩的前身即為生物礁，其生成的過程複雜且歷經環境千萬年以上之變遷。海水中的二氧化碳與鈣質轉化為碳酸鈣成為生物體的殼體或骨骼，生物死後殼體堆積在海床中，故生物礁是在各個不同的地史時期由各種生物遺體所形成的礁體的通稱，由於歷經千萬年之堆疊和沈積，岩層上形成化壓力擠壓，組織變得緊密，即形成石灰岩。而石灰華的成因主要地下水流經易於滲透及有孔隙或節理發達的石灰岩地層，將帶走滲出的鈣離子與次碳酸根離子於水溶液中，當此水溶液滲出岩石外時，因所處之空間驟然變大，導致壓力減小或蒸發時，大量的二氧化碳逸出，碳酸鈣可再沉澱下來，形成鐘乳石、石筍、石柱等。此外，一般的碳酸鈣之沉澱物，常稱為石灰華 (tufa)，其他因形狀不同而有石藤、石簾、滴水石、流石和石枝等種種名稱。石灰華是在陸域上形成，由微晶狀之碳酸鈣，以不甚緊密方式固結而成的碳酸鹽堆積物。一般而言，石灰華是在石灰岩地域中的湧泉或河川、湖的溢流部位形成堤或瀑布狀；其斷面具有多細孔狀，係由微生物生長所遺留的痕跡 (吉村和久等人, 1996)。由於石灰華是由碳酸鈣所構成，形成一鹼性之環境，因此科學家在石灰華中發現了許多鹼性微生物 (Buchardt *et al.*, 1997; Kristiansen and Kristiansen, 1999; Sørensen and Kristensen *et al.*, 2000; Stougaard *et al.*, 2002)。

地質學上又依石灰岩之結構上，又可分為有機質和碳酸鹽礁石。隨著它們的架

構、形狀的不同如具有水滴結構，抗浪結構等，因此有不同的名稱如石藤、石簾、滴水石、流石和石枝等種種名稱。總而言之，石灰華是由微晶狀之碳酸鈣，以不甚緊密方式固結而成的碳酸鹽堆積物。一般而言，石灰華是在石灰岩地域中的湧泉或河川、湖的溢流部位形成堤或瀑布狀；其斷面具有多細孔狀，係由微生物生長所遺留的痕跡 (吉村和久等人, 1996)。由於石灰華的產生歷經長時間的生物、物理、生態和環境變遷影響因子所左右，因此，結構上的分類可幫助推演生物礁形成的模式 (Riding, 2002)。

石灰岩中經常含有大量的化石，已有文獻報告指出，碳酸鹽微生物是扮演深海珊瑚礁形態多樣性的重要角色 (Pratt, 1995)，它提高了石灰層早期的積疊效率 (frame-building)。因此和礁岩之骨架粘著 (Matrix, skeleton and cement, MSC) 有直接的關係。Cowen 亦指出藻類和礁岩早期是維持共生的關係 (Cowen, 1988)。這些的生物包括了如多細胞動物 (metazoan) 等 (Pratt, 1982, 1995; Webb, 1996)、苔蘚蟲、鈣質海綿、孔蟲、石灰藻、珊瑚、貝殼、抱球藻等其他生物。因此，石灰岩之衍生出之石灰華亦探索生物礁學的領域中亦發現了許多嗜鹼性微生物 (Buchardt *et al.*, 1997; Kristiansen and Kristiansen, 1999; Sørensen and Kristensen, 2000; Stougaard *et al.*, 2002)。

這些具世界遺產價值之極端環境中之微生物相的研究，對如石油、天然氣的勘測等學問的探索有重大助益，也衍生出沈積學、古生物學、碳酸鹽岩石學及古生態學等諸多領域，並已逐漸發展為新的學科分支—礁地質學。目前名列世界遺產，世上僅存之澳洲活體生物礁—大堡礁 (great barrier reef)，延綿 2000 公里的海岸線，佔地 3500 萬公頃的栖地內，擁有上千種的水生動物、珊瑚、海綿生物等 (Lucas *et al.*, 1997)。然而，珊瑚礁只是現代生物礁形成的一種方式，而在漫長的歷史長河中的各個不同的地質歷史時期，具有抗浪結構的海相碳酸鹽物質中蘊含的微生物更是值得去探索生命起源、現象的另一個未知的天堂。由於不同的造礁生物各自具有不同的造礁能力，它們的造架、積疊以及附著本領等各有異同，是生物礁的形態也是多種多樣、各有千秋 (竇, 1999)。因此，石灰岩內部都含有豐富的造礁生物的化石。隨著人們逐漸了解生物礁、石灰岩、石灰華形成之複雜關係後而有進一步認識。

第三節、生物多樣性之重要性和指標

在國內，「生物多樣性」在國內，已成為一個學門，其實，在其他國家，它僅被列為一個議題或課題而已，是附屬在「生態學」內。在國內，對於物種多樣性的研究方法、統計分析、學術理論等皆有待更深入的掌握基礎研究，而非僅局限於調查工作。從應用面，如何從制式的「物種調查」、「生態觀察」等進行到如環境生物的消長模式、生態變遷的理論之建立、資源開發等議題才是此學門的研究重點。

由地球上千萬種動物、植物、微生物和它們所擁有的基因，以及由這些生物和環境所構成的生態系構成了生物多樣性。它包括了遺傳多樣性，物種多樣性、與生態系多樣性三個層次。遺傳多樣性是指存在於物種內或物種間的基因多樣性。物種的遺傳多樣性變異愈豐富，它對環境變動的適應能力就愈強，它是農、林、漁、牧品種改良的依據，也是遺傳工程的素材。物種多樣性是人類社會賴以生存和發展的基礎，也是農、林、漁、牧各種生物產業經營的主要對象，它提供了每人生活的必需物質；台灣具有豐富多樣的野生動植物、微生物、真菌類及多樣農、林、漁、牧品種資源，是個遺傳多樣性的寶庫。生態系是由生物及其所生存的環境所構成。而各種生物也依賴著生態系統以延續其生存與演化，生態系的多樣性是維持基因和物種多樣性上不可或缺的，而且生態系更為人類提供水土、養分等重要的服務。

1. 生物多樣性之定義

人類將其周遭各層次的生命有關的生物，不管從大型的至肉眼無法觀察的微生物進行不同層次的分類。從一個小小的生態系，地景系統，甚至整個地球亦可視為一個超級生命體。人類知道地球有各式各樣的生物，且同類生物在構造與外形上，可能有著極大的差異性。人類對這些差異性加以選擇來利用，而且不斷地記錄與描述其不同，尤其是與人類生存相關的物種多樣性更是特別留意。目前世界上有記錄的物種接近 140 萬種，但是若干學者的估算，認為全球的物種可能有 3000 萬。關於已經命名的生物，我們也不知道它們與人類，以及其他生物間真正的關係。許多生物在全球生態系裡所扮演的角色，我們也幾乎一無所知。所以，宣導生物多樣性的概念是我們所要努力的方向。所謂「生物多樣性」之定義為：包括所有層次，從基因、物種到生態系內的各型生命。各層次可以獨自或合併的方式，來呈現生命

的整體現象。且各層次的空間範圍亦可從地方性、區域性或全球性尺度來看待。

2. 生物多樣性之指標

在生物社會裡，其組成分子間，因分類系統 (如不同的科、屬) 與生態習性 (如體型大小、形態及生活週期等) 的不同，再加上時間、空間上的影響，因而漸漸形成生物社會的複雜性及差異性，稱為生物社會的生物多樣性 (biodiversity)。

如何界定歧異度嚴重的影響對生態結構的判斷。為了使生物多樣性的界定更清楚，首先應從生態學之基本分類出發。生態學可分為個體生態學與群體生態學二大部門。前者研究單一個體與環境之關係，通常以種為單位；後者則以生物群體或生物社會及環境之關係，強調組成、結構及分佈與環境之相關性。對於生物多樣性，Ludwig 與 Reynold (1988) 定義生物多樣性為種類豐富度 (species richness) 與均勻度 (evenness) 所組合而成。由實用性出發，將多樣性加以量化，並以多樣性指數模式來表示之。

多樣性指數：

(1) 歧異度 (D) 與均勻度指數 (Evenness)：顯示群落中之種數多寡及個體分佈情形。

A. Simpson 指數

$$D = 1 - \sum (n_i/N)^2$$

n_i ：第 i 種之個體數
 N ：所有 i 種之總個數

B. Shannon 指數

$$H = - \sum (n_i/N) \log_2(n_i/N)$$

n_i ：第 i 種之個體數
 N ：所有 i 種之總個數

C. Evenness = H/H_{\max}

H ：Shannon 指數

H_{\max} ：最大 Shannon 指數 = $\log_2(S)$

(2) 種類豐富度 (E)：可觀察種數相對於群落個體數量的豐富情形。

$$E = S/N$$

S：種數

N：所有種之總個數

第四節、本研究之未來應用潛力

太魯閣國家公園之陸域環境是歷經千萬年之自然生成，微生物之生物活動亦代表了地球上最穩定和最具有代表性的鹼性生物環境之一。研究極端環境微生物在理論上有重要的學術價值。極端環境下微生物的生態、結構、分類、代謝、遺傳等均與一般微生物有別。極端環境微生物有廣闊的應用前景。極端環境微生物的基因，是建構遺傳工程特殊菌種的資源寶庫。這些具世界遺產價值之極端環境中之微生物相的研究，對如石油、天然氣的勘測等學問的探索有重大助益，也衍生出沈積學、古生物學、碳酸鹽岩石學及古生態學等諸多領域，並已逐漸發展為新的學科分支—礁地質學。自然界微生物自古以來產生了許多對人類醫學、工業、農業有用的物質，包括抗體、抗菌物質、酵素、殺蟲劑、微生物肥料、生長調節劑等 (Omura, 1992)。二次代謝物的主要來源為放線菌 (actinomycetes)，其他重要之土壤環境微生物包括 *Bacillus*，粘細菌 (myxobacteria，如 *Myxococcus xanthus* 能抵抗 streptomycin)，綠膿桿菌 (pseudomonas) 等。

自區域石灰華中的微生物包括：

1. 藻類

從本區域分離出來的藻類以螺旋藻 (spirulina) 為主，又稱為藍藻藻類的種類和數量的變化取決於季節之變化，其適合生長之 pH 範圍為 8.0 - 10.0。通常都具有高耐鹽性，可耐濃度為 2-7%，有者高於 20%。螺旋藻有很高之經濟價值，因為它們的細胞質較單純，細胞壁物質含量較少，故較少毒性物質堆積，可作為單細胞蛋白或飼料的添加劑。而今，由於其營養價值與特殊生理作用，如優質蛋白質來源，加上其含有豐富的維他命與礦物質，使得螺旋藻在健康食品界擁有一席之地。

2. 光合細菌

光合細菌的是地球上最早出現的具有原始光能合成體系的原核生物。在自然界中之脫氫、硫化物氧、固氮、固碳等碳、氮、硫迴圈中發揮著重要作用。亦由於其生理類群的多樣性，碳、氮代謝途徑和光合作用機制的獨特性而受到人們的關注。由於高蛋白含量，可當作餌料或飼料添加劑。另可當有機肥料，增強植物的抗病能力。在在食品、化妝品、醫藥保健業中的應用當中，光合細菌保健食品具有延緩衰老、抑制腫瘤、免疫調節、調節血脂的顯著功效。

3. 放線菌

放線菌為自然界土壤中存在極為普遍的革蘭氏陽性細菌，已知種類超過四百種，由於多數具有產生抗生物質的能力，在作物病害防治上的應用。已成功分離出來並商品化的有 streptomycin (鏈黴素)，blasticidin-S，polyoxin 與 validamycin 等，應用於多種果樹與蔬菜細菌性害病的防治和微生物的入侵。

在生物技術的應用面，嗜鹼性微生物富含耐鹼性酵素如澱粉分解酵素、蛋白質分解酵素、纖維素分解酵素，目前已應用於清潔劑、食品、藥品、皮革工業等 (Horikoshi and Akiba, 1982; Horikoshi, 1991)，另外如自 X-ray 膠片中回收銀，自廢棄物如毛皮、毛髮中純化有用物質等 (Anwar and Saleemuddin, 1998)。目前已工業化的應用是纖維素酵素用作清潔劑的添加劑。酵素用於增加清洗效率已有超過三十年歷史。全球生產的酵素當中，有 30% 的酵素是被應用於清潔劑工業上，是已知所有的生物技術應用產品當中最成功的。鹼性蛋白分解酵素廣泛用於洗滌劑，最初用於牲畜加工廠，後來也迅速發展為商用家用洗滌劑。在醫療的使用上，鹼性酵素的應用性也不斷的擴充，自七十年代以來，日本已自 *Bacillus sp.* 發現純化多種鹼性酵素包括木聚糖分解酵素、甘露聚糖分解酵素、澱粉分解酵素、果膠分解酵素、環糊精轉化酵素 (CGTase) 等，如後者在食品和化妝品業當作穩定劑，防止在貯存過程中的物化性變質 (Horikoshi and Akiba, 1982; Fukumori *et al.*, 1989; Ito *et al.*, 1989; Takami *et al.*, 1989)。

第二章、材料與方法

第一節、儀器設備與套組

1. 土壤 DNA 萃取套組 FastDNA® Spin Kit (BIO101, USA)
2. DNA 純化套組 Wizard® DNA purification system (Promega, USA)
3. 轉型系統 pGEM®-T Vector Systems (Promega, USA)
4. ECOS® competent cell (Yeastern Biotech, Taiwan)
5. GM-T® Gel Extraction kit (Yeastern Biotech, Taiwan)

第二節、方法

(一) 16S rRNA 之放大和選殖

土壤之總 DNA 利用市售套組 FastDNA® Spin Kit 抽取後，再經由 Wizard® DNA purification system 純化，利用引子對 BSF8 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)，BSF1520 (AAGGAGGTGATCCANCCRCA) 放大 16S rRNA 的 (*Escherichia coli* numbering 8 - 1510)。進行反應總體積為 25 ul 之 PCR 反應。5 ul 之 DNA 模板，5 ul 1 mM 之 dNTP，0.5 uM 之 F1 和 R1 引子，0.5 ul *Taq* DNA polymerase, 10X PCR buffer 2.5 ul，其餘以去離子水補齊至 25 ul。條件為 initial heating 95 °C，2 min, 30 個循環之 95 °C，5 sec; 60 °C，30 sec; 72 °C，1.5 min; and final extension 72 °C，10 min。放大之 PCR 產物以 Gel Extraction kit 純化後接合至 pGEM®-T Vector Systems，最終轉形至 ECOS® competent cell，塗抹在含有 50 ng/ml Ampicilin, IPTG 和 X-gal 之平板上進行 12-16 小時 37 °C 之藍白篩選。

(二) 定序、資料庫比對、多樣性指數計算

自平板培養基中觀察白色之菌落，挑起白色菌落，個別培養於新鮮之含抗生素 LB 平板，培養於 37 °C，至有白色菌落出現後，依 Promega 手冊使用 T7 forward 和 SP3 reverse 引子對進行 colony PCR。擁有正確大小 insertion 之 PCR 產物 (vector

200 bp 加上 insert 1.5 kb 約 1.7 kb) 經由刀片割膠，再以 GM-T® Gel Extraction kit 純化回收 DNA，進行 16S rRNA 定序 (明欣生物科技，台灣)。定序結果送至 Genbank 資料庫比對。將所得的比對結果利用 BioDiversity Pro version 2 軟體進行計算。

(三) 螢光原位雜交

1. 探針

螢光原位雜交探針針對者 Proteobacteria 之序列為 CTACTGGGGTAT CTAATCC，並於 5' 端標定 Cy3 (綠); 針對光合菌者為 Cyan785 (5'-CTACTGGGGTATCTAATC)，於 5' 端標定 Cy5 (紅) (波士特生物科技)。

2. 螢光原位雜交樣本前處理 (sample fixation)

土壤 DNA 經由 Christensen 等人 (1999) 之萃取後，以 3.7 % (wt/ vol) formamide 固定; 泉水樣本則是取 10 ml 在 5 mm Hg 的真空度下過濾收集在 GTTP 濾膜。於過濾膜上加 1 ml 2 % (wt/ vol) NaCl-50 % (vol/ vol) ethanol 靜置 1 min 再抽氣過濾乾燥，可儲存在 -20 °C 備用。

3. 螢光原位雜交和顯微鏡觀察

將濾膜置於 5.5 cm 之培養皿上加入 1 ml 預熱之雜合反應液 (hybridization solution, 50-70 % (vol/vol) formamide, 10 % dextran sulfate, 0.01 % (wt/vol) poly A (Llobet-Brossa *et al.*, 1998) 和 5 X SET (1 X SET is 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.8), 500 ng 之螢光標定寡核苷酸探針 將 petri dish 置於雜交反應箱 (億德, 台灣) 進行 12 小時之 55 °C 雜合反應。以 5 ml wash solution (0.2 X SET and 50 % (vol/ vol) formamide) 於 50 °C 下進行 2 小時洗去非專一性之雜合。螢光顯微鏡使用型號 Eclipse E600 配搭 Y-FL Epi-fluorescence attachment microscope (Nikon, Japan), Super High Pressure Mercury Lamp (HB-10103AF, Nikon, Japan), 100 X Plain Fluor Objective (Nikon, Japan), 影像採用數位元相機拍攝 (Coolpix 4500, Nikon)。

第三章、結果與討論

第一節、採樣地點之說明

白楊步道入口在中部橫貫公路 168 公里處，距離天祥西方約 500 公尺。由早期台灣電力公司的施工道路整建而成。主要的景色以溪流、山谷為主美景為主。途經數個隧道和溪流。峽谷景觀較壯麗精華，橋下的激流與深潭，非常驚險。白楊橋對岸另一隧道即通往水濂洞之途徑，但因經過多次地震與颱風，已成容易崩坍的危險地區，遊客只能在白楊橋附近遠望白楊瀑布，或過支流溪的吊橋，到觀景台回望白楊橋的景觀與塔次基裏的峽谷。

長春祠步道因腹地狹小僅可供遊客眺望觀察，故提供簡易遊憩設施、停車場、衛生設施以作短暫停留遊憩之所需。本區地層不穩定，易發生落石坍方，地質為薄層大理岩及鈣質石英片岩的互層，地質較不穩定，加上位於曲流攻擊坡，更容易產生落石。由於立霧溪的下切作用，長春祠西側河流轉灣處可見堆積層的蹤跡。

燕子口早年因常有雨燕、洋燕在太魯閣之峭壁上岩洞築巢而棲，以燕子口-錐麓斷崖-九曲洞一帶的塊狀大理石岩最為壯觀。這些大理石岩的原岩是石灰岩，因受變質作用轉變成大理岩，其中錐麓斷崖部分，修築在海拔 800 公尺左右，視野遼闊，是最精華的一段，且留有合歡越嶺古道的遺跡，為太魯閣國家公園中唯一的史蹟保存區。

第二節、採樣點的選擇及石灰華的特性

台灣東部沿著海岸有一幾乎成南北走向、厚達 1000 公尺的石灰岩地層。太魯閣峽谷即位於台灣東海岸的中心都市—花蓮北方，乃由於一約略由西向東橫貫此地區的立霧溪，深深的侵蝕刻鑿而成，但在立霧溪河流兩岸附近卻也矗立著超過 2500 公尺的高山。因此，地形險峻是此峽谷的特徵之一。

太魯閣峽谷的氣候，是屬於亞熱帶氣候，以綠水 (標高 413 公尺) 為例，年平均氣溫為攝氏 21.7℃，年平均降雨量為 2316 毫米。太魯閣地區一年中的大部分時間都是溫暖且多雨高濕之氣候 (吉村和久等人，1996)。

在太魯閣峽谷內三個地點採石灰華樣品，如圖一所示，分別為長春祠、白楊步道外(中橫 168 Km 標示處，洞內)及燕子口隧道變電箱旁。採樣地點的經緯度如表一所示。

長春祠是為紀念因開闢中部橫貫公路殉職之人員而建。在長春祠下方湧出的泉水在流入立霧溪時，形成一座高低差約 20 公尺的瀑布，石灰華就是位於這個瀑布的周邊斷崖。這片石灰華覆蓋於寬約 30 公尺，高度差約 10 至 20 公尺的岩壁；此壁可能是由於流水往橫向流動後，隨之發育而形成。在瀑布下面的河床上有一塊寬約 9 公尺、高約 4 公尺的石灰華塊 (圖二 A)，據吉村和久推斷，它可能是因為本身太重而斷落 (吉村和久等人，1996)。本研究第一個採樣點就是這塊石灰華塊。因為太魯閣地區石灰華有很完全的太陽光照射，且表面上有大型的藻類附著，以肉眼及顯微鏡觀察所採集的石灰華樣本 (如圖二 B)，可發現其斷面有許多附著物，且有不連續的大小的孔隙狀構造，於附著物上有許多不足 10 微米大小的方解石 (calcite) 結晶，其上有藍菌包圍生存。

在長春祠之上游，白楊步道口外的中橫公路 168 公里路標旁有小洞窟，其周邊的崖上方流出的地下水下中，部分有石灰華形成。圖三 A 所示為覆蓋小洞窟左側崖壁的石灰華。此處之水流流量小，因此形成之石灰華表面沒有大型的藻類附著 (圖三 A)；檢視其橫切面 (圖三 B)，也沒有不連續的大小的孔隙狀構造，但其上仍有藍菌包圍生存。

另外，位於天祥東方約 10 公里的燕子口，亦即立霧溪的崖壁上經確認也有幾處發育良好的石灰華。此地石灰華的規模較長春祠的小；又此地域的河床附近兩岸均為峭立的懸崖，石灰華的日照條件較是三個地點中最差，且雨水無法直接沖蝕此地，因此此地之石灰華 pH 值為三個地點中最高的 (表一)，而且可以直接看到正在結晶的情形 (圖四 A)。

石灰華為石灰岩地域涵養的地下水流出地表之際所生成，主要是因為水中所溶含之二氧化碳逸失而形成 (decarbonation)。以平衡或過飽和狀態溶解於水中的方解石，因細菌、藻類及苔蘚類之光合作用，使水中之二氧化碳減少而形成過飽和狀態，造成碳酸鈣沉澱。如此因生物的活動而間接地參與沉澱生成的現象稱為生物導因性結晶 (biologically induced mineralization) (吉村和久等人，1996)。

一般而言，在國外的石灰華上大多能觀察到有數公厘寬的年條紋 (類似年輪)。



圖一、採樣地點位置示意圖

Fig 1. Sampling sites in Taroko National Park

表一、石灰華採樣地點紀錄表

Tab 2. Properties and location of the sampling sites

	Location	GPS		Latitude (M)	樣本	Water	Temp (°C)
					pH	pH	
1	長春祠	N24°09'40.1"	E121°36'13.2"	68	9.0	7.8	18
2	白楊步外 (168Km)	N24°11'29.2"	E121°29'21.9"	546	8.2	8.2	17
3	燕子口隧 道變電箱	N24°10'23"	E121°32'21"	-	10.1	8.4	17

A



B



圖二、長春祠瀑布型石灰華 (A); 石灰華表面石灰結晶 (B)。
Fig 2. Tufa sampled from Chang Chun temple.

A

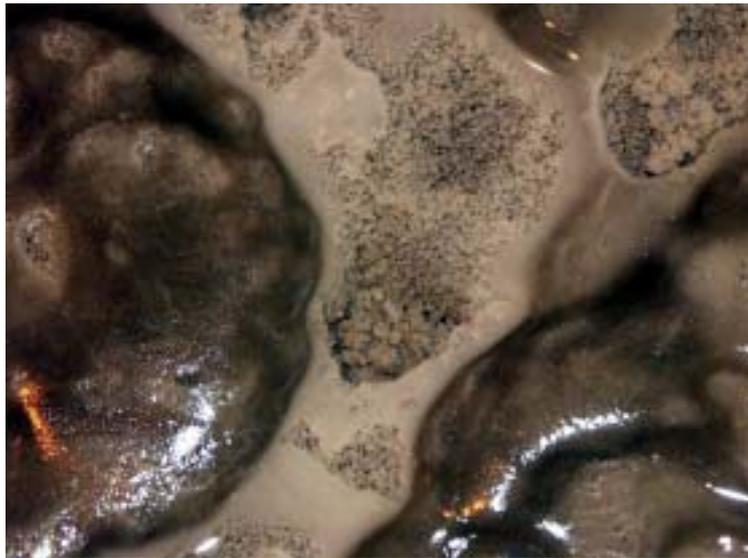


B



圖三、白楊步道外 (168Km) 波狀石灰華 (A); 石灰華橫切面 (B)。
Fig 3. Tufa sampled from Bai Yang walkway (168 km).

A



B



圖四、燕子口隧道變電箱旁結晶中之石灰華 (A); 石灰華表面石灰結晶 (B)。

Fig 4. Tufa sampled from Swallow valley entrance.

這是因為如藍菌等生物著生於石灰華表層之生物，進行光合作用時，大量參與化學反應過程所致。在因生物作用而有季節性變化的地區，大部份石灰華都有此條紋狀構造 (吉村和久等人，1996)，但是在這次採取的石灰華標本上(圖二至四)，並無此條紋狀構造存在。這是因太魯閣為當地屬於亞熱帶氣候區，其生物活動的季節性變化與較國外為小的緣故。而且如前所述，在所採集的石灰華上可觀察到不連續狀的較大孔隙構造，這是大型植物的如苔蘚等的生長痕跡。石灰華的表層附著物中，能確認有許多在國外也能看到的藍菌，但是因高光照量的緣故，苔蘚類或高等植物也可生長於其上 (圖二 A)。因為石灰華迅速沉澱在這些植物的周圍，使這些植物被包圍在石灰華中，而造成孔隙構造 (圖二 B)。

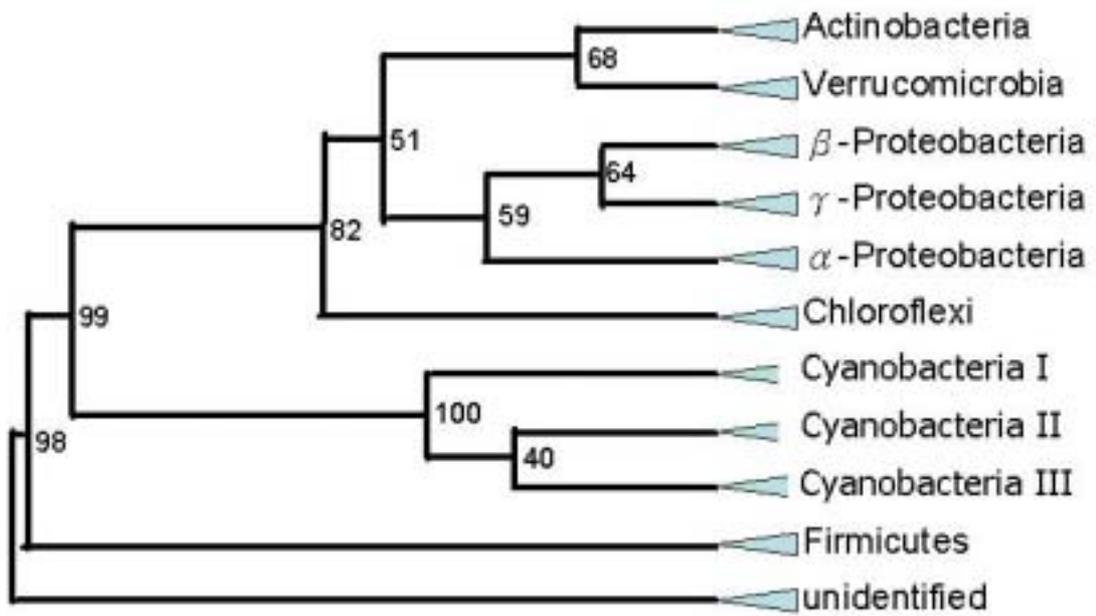
第三節、石灰華之微生物多樣性

1. 石灰華之微生物菌相的分類鑑定

長春祠、白楊步道外 168 Km 和燕子口三種石灰華樣品之 16S rDNA clone library clones 數如表二所示，對三種石灰華樣品之 clone library 做定序分析，這些序列取樣 100 次後，經 neighbor joining 運算出一張分類樹狀圖 (圖五)，結果這些菌落可分成 11 個親緣關係不同的族群，而由圖上標示的 bootstrap 值看到，大部分分支點都大於 50。每群之序列和 GeneBank 比對後可得知每一分群之主要菌相為那一種細菌 (表二)。Bootstrap 的意義，可以先由其算法了解。一張樹狀分類圖的結果，是由比較各物種間不同特徵來完成，而如果我們改變了物種的比較順序或者特徵的排列順序，那將都會有不同的分類圖結果。因此取樣的次數，代表隨機排列物種及特徵的次數，所得到的分類圖個數即為取樣次數，之後可經由程式綜合運算出最理想之分類圖。此張分類圖上分支點的數字即代表此分支點在所有分類圖中出現之次數。愈高之值即代表出現的次數愈多，可信度也就愈高。

2. 石灰華之微生物多樣性指標

各種石灰華之微生物 16S rDNA clone library 所呈現出的生態意義，由三種不同



圖五、三種石灰華 318 個 16S rDNA clones 之 11 分群間關係。
 Fig. 5 Eleven 16S rRNA phylotype inferred from 318 clones library from the three sampling sites.

表二、三種石灰華樣品 Clone libraries 之個數
 Tab. 3 Clone libraries number of three sampling site

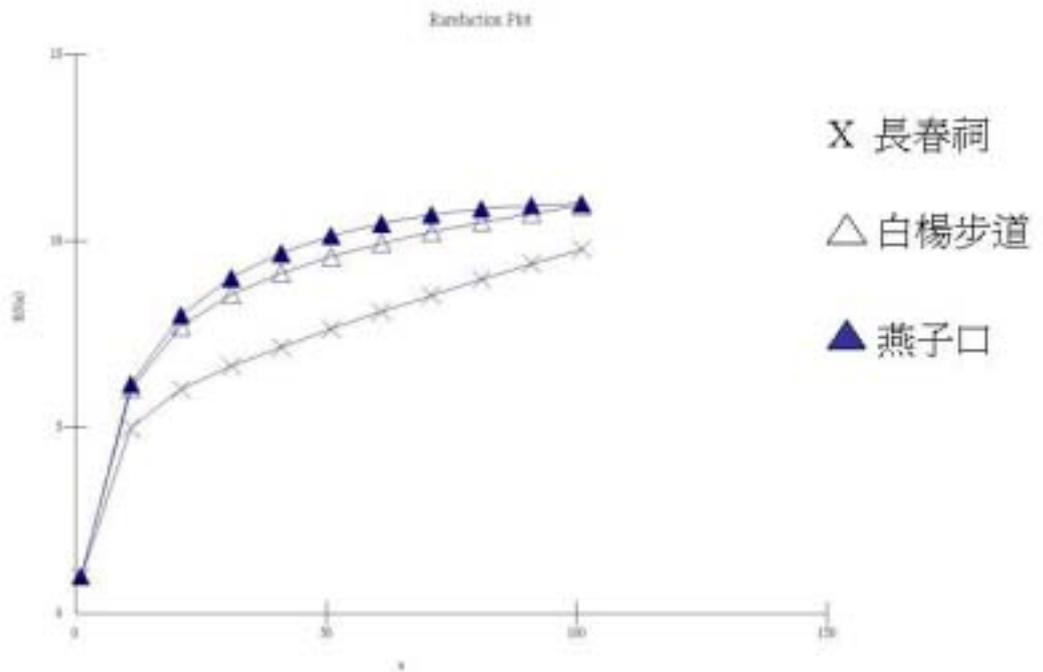
	長春祠	白楊步道外 168Km	燕子口
Actinobacteria	14	18	20
Verrucomicrobia	1	1	3
β -Proteobacteria	1	6	5
γ -Proteobacteria	2	11	12
α -Proteobacteria	12	18	17
Chloroflexi	0	1	2
Cyanobacteria I	22	17	13
Cyanobacteria II	21	20	23
Cyanobacteria III	13	6	7
Firmicutes	1	3	4
Unidentified	1	2	3
總數	88	103	109

的指標來表示。圖六表示三種石灰華之微生物 16S rDNA clone library 挑選之菌落數與出現之 phylotype 間關係，挑選愈多之菌落，所得到之菌株種類也應當愈高。由此圖可看出燕子口具有較高之多樣性，白楊步道外次之，而長春祠較低。顯示出可能長春祠的採樣點是最靠近遊憩地點，使得人為干擾增加，瀑布所流出的水可能遭受污染，因而降低了多樣性。

表三以數字將各指標加以量化，因為三種石灰華之 16S rDNA clone library 挑選的菌落數不同，所以 E(S) 值以較少的菌落數為基準，計算比較出個樣品間的差異。E(S) 值長春祠、白楊步道外、燕子口分別為 9.77、10.94、10.99，由數據可看出白楊步道外和燕子口具有較多之物種個數，長春祠最低。此值的意義，和圖六之圖示相同。Evenness 即均勻度，表示物種在環境中的分佈情形，各物種數目愈接近，則有愈高之數值。在長春祠的石灰華樣品中，或許是遭受污染的瀑布所流出水提供了比較強的養分，導致優勢菌種的產生，均勻度也就下降，而白楊步道外和燕子口的石灰華樣品中此現象較不顯著，可能是這兩地的地下水是由地底湧出，完全沒有汙染。D 值表示多樣性的高低，也和前兩個指標的結果一致，顯示白楊步道外和燕子口具有較高之多樣性，長春祠最低。

3. 各石灰華之細菌族群分析

取各種石灰華之微生物 16S rDNA clone library 來分析菌相，對三種石灰華樣品之所有 16S rDNA clone library 做定序分析，再將序列至 GenBank 中比對資料庫鑑定至屬和種 (genus and species) 之層次 (表四)，即可分析三種石灰華樣品之微生物菌相分佈和含量，另結果如表五和圖七、八所示。在其中可發現，藍綠菌 (Cyanobacteria) 在石灰華之微生物中佔有最大之比例，約 40-60%；第二多的微生物則是 Proteobacteria。依據各種石灰華樣品不同的微生物菌相分佈結果，可以依微生物環境把三種石灰華分類 (圖九)，可看出長春祠的石灰華樣品之微生物組成差異性最大。比較三種石灰華樣品之 pH 值 (表一)，長春祠、白楊步道外 168 Km 和燕子口三種石灰華樣品之 pH 分別為 9.0、8.2 和 10.1，白楊步道外 168 Km 和燕子口的石灰華樣品之 pH 差異最大，但微生物相最相似，因此推論 pH 值對微生物相的差異不是主要的因素。



圖六、三種石灰華的豐富度曲線

Fig. 6 The Richness curve of three sampling sites.

表三、三種石灰華之多樣性指標

Tab. 3 Biodiversity index of the three investigated sites.

Index	Clone libraries		
	長春祠	白楊步道外 168Km	燕子口
$E(S)^a$	9.77	10.94	10.99
Evenness ^b	0.768	0.9	0.916
D^c	0.808	0.864	0.866

^a E was calculated by rarefaction for a standardized sample size of 101 clones for each clone library.

^b H was calculated as follows: $H = - \sum (p_i)(\log_2 p_i)$ where p_i is the proportion of the i th phylotype.

Evenness (E) was calculated from H as follows: $E = H/H_{\max}$, where $H_{\max} = \log_2(S)$ and S is the total number of phylotypes.

^c D was calculated as follows: $D = 1 - \sum(p_i)^2$. The scale for D ranges from 1 to D_{\max} , where $D_{\max} = 1 - 1/(S)$.

表四、三種石灰華樣品菌種之分佈

Tab. 4 Microorganism and their affiliation found in three sampling sites

分 群	分 佈 比 例 (%)			相 似 菌 種 *	分 類 地 位
	長春祠	白楊步道外	燕子口		
A	22.43	17.31	18.69	Bacterium Ellin5247 (AY234598)	Actinobacteria (phylum BXIV)
B	0.93	0.96	2.80	Uncultured verrucomicrobium (AJ401113)	Verrucomicrobia (phylum BXXII)
C	0.93	5.77	4.67	<i>Arthrospira sp.</i> (X70769)	β -Proteobacteria (phylum BXII)
D	1.87	10.58	11.21	<i>Oceanimonas smirnovii</i> (AY538714)	γ -Proteobacteria (phylum BXII)
E	11.21	17.31	15.89	<i>Hyphomicrobium facile</i> (Y14311)	α -Proteobacteria (phylum BXII)
F	0.00	0.96	1.87	uncultured bacterium (AJ009460)	Chloroflexi (phylum BVI)
G	20.56	16.35	12.15	Phormidium autumnale (AF218371)	Cyanobacteria (phylum BX)
H	28.04	19.23	21.50	<i>Arthrospira sp.</i> (X70769)	Cyanobacteria (phylum BX)
I	12.15	6.73	6.54	<i>Symphyonemopsis sp.</i> (AJ544085)	Cyanobacteria (phylum BX)
J	0.93	2.88	1.87	<i>Bacillus silvestris</i> (AY167818)	Firmicutes (phylum BXIII)
K	0.93	1.92	2.80	Forest soil firmicute (AY043547)	unidentified

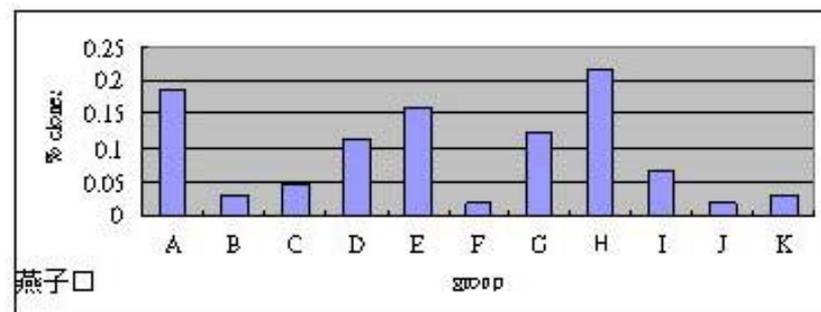
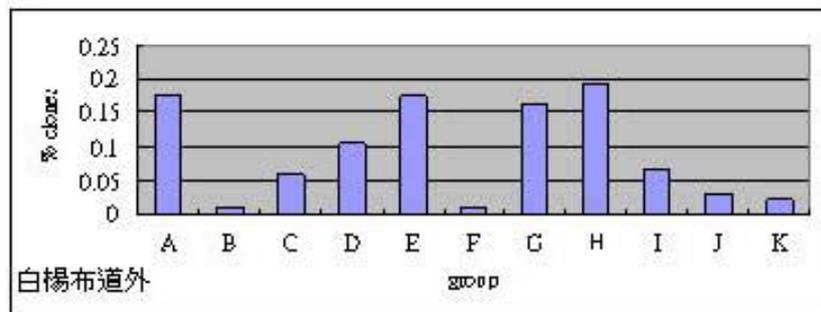
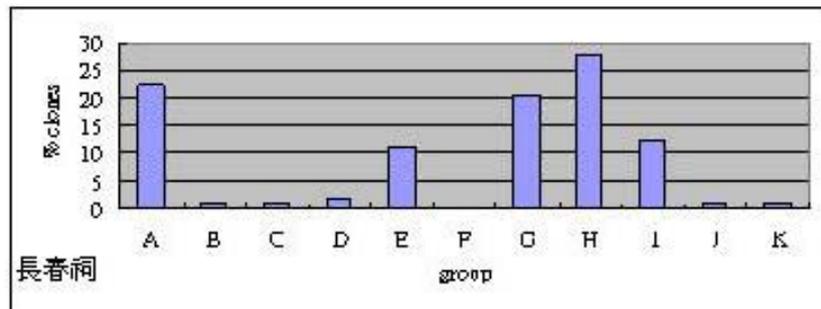
*括號內為菌種序列在 GenBank 的 Accession number。

表五、採樣地點之微生物屬名

Tab. 5 Genus investigated in this study

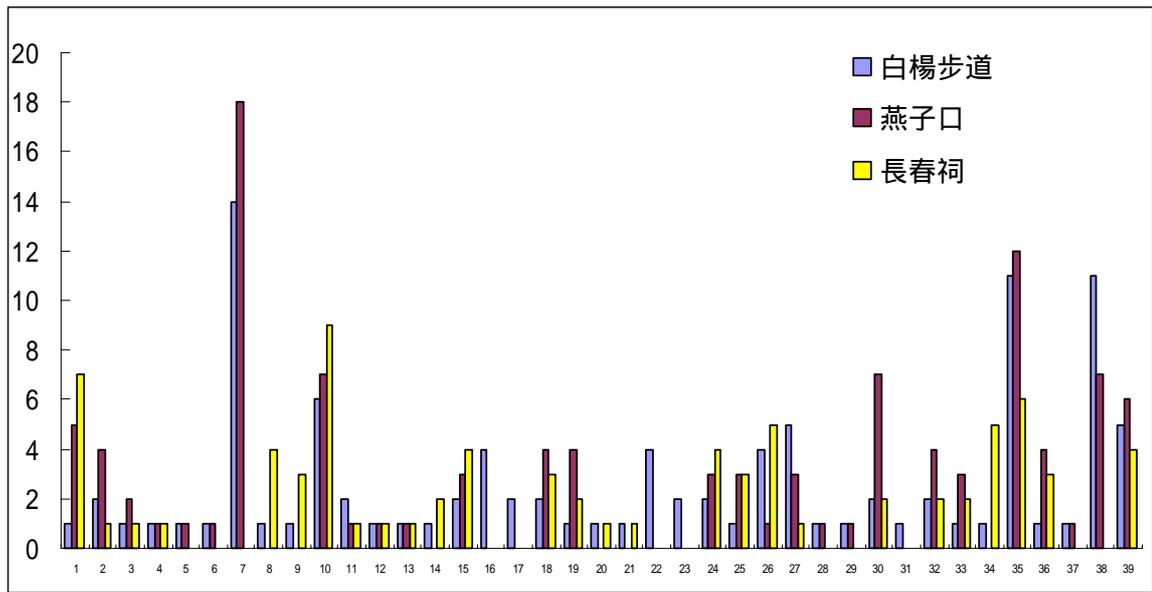
	白楊步道	燕子口	長春祠
1. Acidobacteria	1	5	7
2. Achromobacter	2	4	1
3. Agricultural soil bacterium	1	2	1
4. Alpha proteobacterium	1	1	1
5. Aphanothece	1	1	0
6. Aquamonas	1	1	0
7. Arthrospira	14	18	0
8. Asticcacaulis	1	0	4
9. Bacillus	1	0	3
10. Bacteria	6	7	9
11. Bdellovibrio	2	1	1
12. Firmicute	1	1	1
13. Fulvimonas	1	1	1
14. Gloeotheca	1	0	2
15. Hyphomicrobium	2	3	4
16. Leptolyngbya	4	0	0
17. Maricaulis	2	0	0
18. Methylocystis	2	4	3
19. Microcoleus	1	4	2
20. Nitrosomonas	1	0	1
21. Nitrospira	1	0	1
22. Oceanimonas	4	0	0
23. Ochrobactrum	2	0	0
24. Oscillatoria	2	3	4
25. Phenyllobacterium	1	3	3
26. Phormidium	4	1	5
27. Pseudomonas	5	3	1
28. Pseudomonas	1	1	0
29. Rhodospirillum	1	1	0
30. Sinorhizobium	2	7	2
31. Sphingomonas	1	0	0
32. Spirulina	2	4	2
33. Spirulina	1	3	2
34. Sulfur-oxidizing bacterium	1	0	5
35. Symphyonemopsis	11	12	6
36. Synechococcus	1	4	3

37.Verrucomicrobium	1	1	0
38.Uncultured eubacterium	11	7	0
39.Unclassified Bacteria	5	6	13
Total	103	109	88



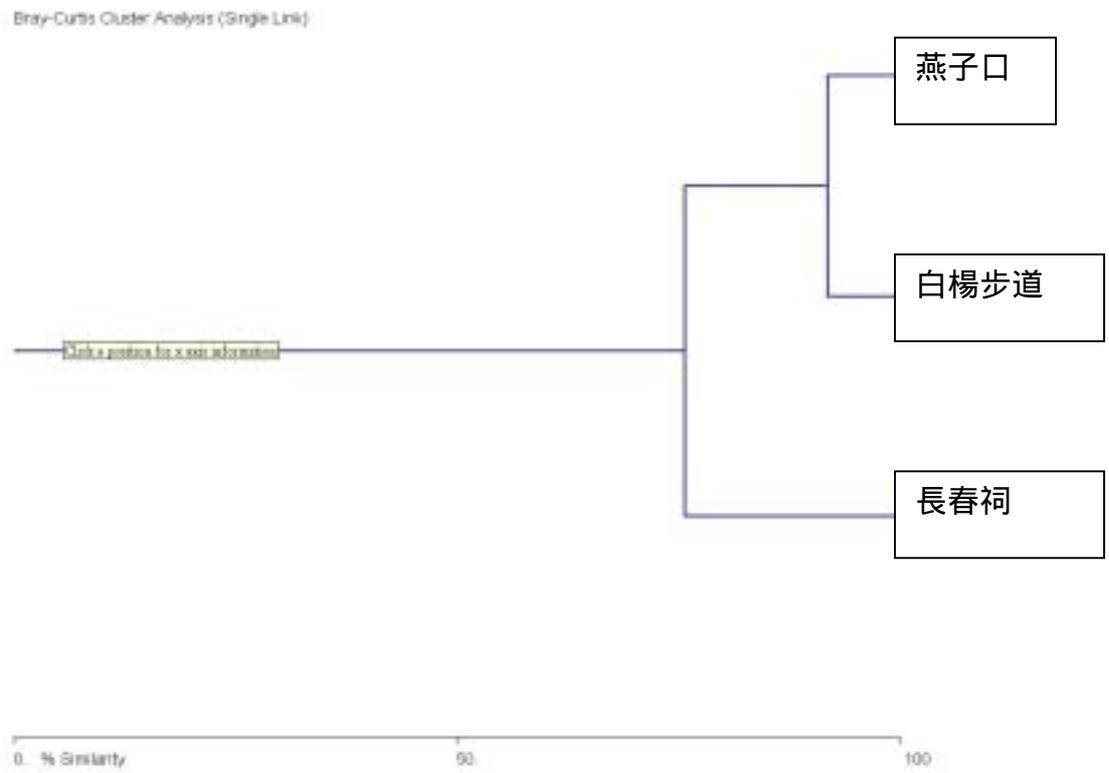
圖七、三種石灰華中各群微生物含量。

Fig. 7 Percentage of 11 groups found in three sampling sites



圖八、採樣點之微生物分佈，以光合細菌 *Arthrospira sp.*和 *Symphyonemopsis* 佔最多

Fig. 8 Distribution of microbes found in three sampling sites. *Arthrospira sp.* and *Symphyonemopsis* are found to be the dominant microbes



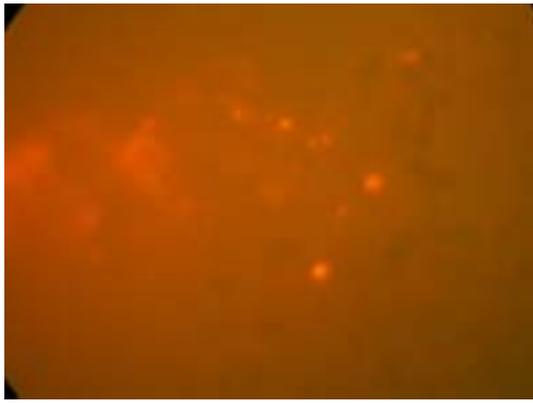
圖九、以細菌族群分類三種石灰華環境樹狀圖

Fig. 9 Phylotype tree of three sampling sites

由於長春祠的採樣點環境具有充分的日照，其石灰華樣品中具有相當多的苔蘚，具有不連續狀的較大孔隙構造，這些也會影響其微生物相，所以這也可能是其微生物相和另二個樣品差異較大的因素。其中以 *Arthrospira*，*Symphyonemopsis* 等屬之光合細菌最多，另外有一大部份是未可自 NCBI 資料庫比對出來之不明菌種和不能經由培養之菌種。顯示本區域很可能存在其他未登錄之菌相，具有持續開發之契機。依據各種石灰華樣品不同的微生物菌相分佈結果，將三種石灰華分類，可知長春祠的石灰華樣品之微生物組成差異性最大。白楊步道外和燕子口之石灰華微生物則具較高之相似性。經由期末對選殖之三處地點微生物 16S rRNA 重新分離、定序、比對發現，長春祠比對出另一支光合菌 *Arthrospira*，而且本區域之未能在資料庫比對的序列較白楊步道和燕子口者多，可以解釋的原因可能是長春祠為三個採樣地點中地層屬於最不穩定的，經常發現落石的事故，因此環境變異性高很有可能是造成調查成果上之差異。

4. 螢光原位雜交

基於期初之成果發現光合細菌和 Proteobacteria 是本區域之優勢菌種，因此本部份旨在以經由標定 Cyan785 和 Proteobac 二個探針對三處地點樣本進行雜交和觀察。從圖二為放大 1000 倍之螢光顯微鏡下觀察。長春祠可雜合上之訊號較高，說明光合細菌和 Proteobacteria 含量較多 (圖十E, F)。在 FISH 中，影響結果的變數相當多。其中溫度、濕度直接影響著探針和目標 DNA 的雜交效率、光照影響了螢光染料的強度，各種試劑的 pH 是否符合要求直接關係到 FISH 的穩定性。本部份得出結論和 16S rRNA 之序列和多樣性指數雷同，說明長春祠微生物相很有可能因為地理因素或人為的因素帶來衝擊。



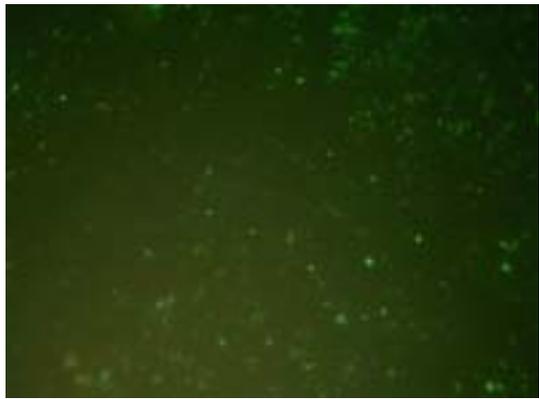
(A)



(B)



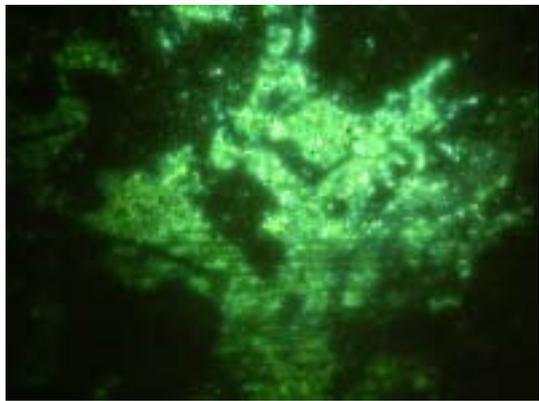
(C)



(D)



(E)



(F)

圖十、採樣地點之螢光原位雜交。白楊散步道 (A,B)、燕子口 (C,D) 和長春祠 (E,F) 分別以 Cyan785 和 Proteobac 標定紅色 (Cy5) 和綠色螢光 (Cy3)。

Fig. 10 FISH microscopic of three sampling sites. Bai Yang walkway (A, B); Swallow valley entrance (C, D) and Chang Chun Temple (E, F) were dyed with Cy5 and Cy3 respectively.

第四章、總結與建議

1. 在太魯閣峽谷內三個地點採石灰華樣品，分別為長春祠、白楊步道外(中橫 168 Km 標示處，洞內)及燕子口隧道變電箱旁。
2. 長春祠之石灰華樣品表面上有大型的藻類附著，且有不連續的大小的孔隙狀構造，於附著物上有許多不足 10 微米大小的方解石 (calcite) 結晶，其上有藍菌包圍生存。
3. 三種石灰華樣品中，並無因著生於石灰華表層之生物，進行光合作用時，大量參與化學反應過程所產生條紋狀構造存在。
4. 三種石灰華樣品之微生物多樣性分析，結果為長春祠、白楊步道外(中橫 168 Km 標示處，洞內)及燕子口隧道變電箱旁三者之多樣性分別為 0.808、0.864、0.866；均勻度為 0.768、0.9、0.916。
5. 分析三種石灰華樣品之微生物菌相分佈和含量，結果發現，Cyanobacteria 在石灰華之微生物中佔有最大之比例；第二多的微生物則是 Proteobacteria。
6. 依據各種石灰華樣品不同的微生物菌相分佈結果，將三種石灰華分類，可看出長春祠的石灰華樣品之微生物組成差異性最大。白楊步道外 168 Km 和燕子口三種石灰華樣品之微生物菌相較相似。

本研究之終極目標在於：

1. 調查之結果，可充實太魯閣國家公園現有除動植物外之微生物遺傳資源，使生物相之了解可更形完成。
2. 可以了解太魯閣峽谷中石灰岩地帶石灰華中之微生物分布，比對好鹼性微生物的種類，使我國遺傳資源之掌握更清晰，做為未來實踐保育利用分享之生物多樣性目標之基礎。
3. 以遺傳多樣性為指標，長期監測記錄其微生物多樣性之變遷，做為未來環境變化的指標與開發限制的依據

太魯閣國家公園地形歷經千萬年之造山運動而來，生態、景觀、動植物、人文史蹟等皆代表了重要的生物演化依據和高追溯性。目前在管理上亦導入了生態、保

育、教育等政策，並加強落實本區域之生物多樣性關於保育、利用、分享之總體目標。本計畫做為保育教育應用層面之基礎研究，期初工作以微生物基因選殖和多樣性指數探勘描述本區域微生物基本資料，建立基礎資料庫，充實先前所較為缺少的微生物資源調查及描述。期末以螢光原位雜交技術加以鑑定和驗證期初工作成果。

未來本區域環境微生物遺傳多樣性研究之總體目標和開發策略，可選定某一微生物變異度大之環境，如本計畫中的長春祠石灰華區域，自此環境分離出單一菌株後，進行菌種生長條件之篩選。確立了分離株之後，不論從基因層次或新興之蛋白質體學切入，皆有很大的研究潛力。從另一角度來看，亦可結合景觀、環境、地理、生態學門，研擬太魯閣國家公園之生態變遷評估模式。

採樣地點集合了特殊環境微生物多樣性高、地理環境變異度大、旅遊人數多和史蹟保存度深等特質，除了提供微生物推廣應用外，亦作為評估環境生態指標的重要依據。多數生態研究上，環境變遷若無指標性動植物顯現變遷徵兆，待大型哺乳動物或喬木等植物死亡，亡羊補牢恐為時已晚。故本研究可提供另一層面的參考，即建立以微生物消長的角度評估環境變遷的契機，使本區域的建設、開發、維護、管理更符合原有的經營理念，永續利用、民眾教育、恆久傳承。

第五章、謝 誌

本計劃承蒙內政部營建署太魯閣國家公園管理處提供研究經費，並得到太魯閣國家公園管理處人員提供樣品採集之協助。僅此致謝。

參考文獻

中文部分

- 吉村和久、井倉洋二、高橋恆太、陳元陽、劉慶男、陳孟江。1996。太魯閣谷中石灰岩地帶之石灰華。太魯閣國家公園管理處。
- 竇光宇。陌生而誘人之生物礁。海洋世界。1999 vol 9
- 楊遠波。2004。太魯閣國家公園高山地區植物資源及基礎調查研究。太魯閣國家公園研究計畫。pp. 1-2。

英文部分

- Anwar, R., Saleemuddin, M. 1998. Alkaline proteases: a review. *Bioresour. Technol.* 64, 175–183.
- Buchardt, B., Seaman, P., Stockmann, G., Vous, M., Wilken, U., Düwel, L., Kristiansen, Aa, Jenner, C., Whiticar, M. J., Kristensen, R. M., Petersen, G. H., and Thorbjørn, L. 1997. Submarine columns of ikaite tufa. *Nature* 390: 129–130.
- Christensen, H., Michael, H. and Jan, S. 1999. Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence in situ hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Appl Environ Microbiol* 65: 1753 -1761.
- Cowen, R., 1988. The role of algal symbiosis in reefs through time. *Palaios* 3, 221– 227.
- Ferris, M. J., Ruff-Roberts, A. L., Kopczyński, E.D., Bateson, M. M. and Ward, D. M. 1996. Enrichment culture and microscopy conceal diverse thermophilic *Synechococcus* populations in soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 10450 - 1050.
- Fukumori, F., Kudo, T., Sashihara N. 1989. The third cellulase of alkaliphilic *Bacillus* sp. strain N-4: Evolutionary relationships within the cell gene family. *Gene* 76: 289 - 298.
- Guckert, J. B., Gregory, J. C., Troy, D. J., Burt, G. H., Daniel, H. D., Yoshiharu, k. 1996. Community analysis by BIOLOG: curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats. *Journal of Microbiological Methods* 27: 183-197.
- Grant, W. D. (1992) Alkaline environments. In: *Encyclopedia of Microbiology*, Vol. 1. Lederberg, J., ed. London: Academic Press, pp. 73–80.
- Horikoshi, K., 1971. Production of alkaline enzymes by alkaliphilic microorganisms. Part I: Alkaline protease produced by *Bacillus* No. 221. *Agric. Biol. Chem.* 35 (9), 1407 – 1414.
- Horikoshi, K. 1991. General view of alkalophiles and thermophiles. In: *Superbugs: Microorganisms in Extreme Environments*. Berlin: Springer, pp. 3–14.
- Horikoshi, K., 1991. Microorganisms in Alkaline Environments. VCH, New York.
- Horikoshi, K., Akiba, T., 1982. *Alkaliphilic Microorganisms. A New Microbial World*. Japan Scientific Societies Press/Spring.
- Ito, S., Shikata, S., Ozaki, K. 1989. Alkaline cellulase for laundry detergents: Production by *Bacillus* sp. KSM-635 and enzymatic properties. *Agric. Biol. Chem.* 53: 1275 -1281.
- Jones, B. E., Grant, W.D., Duckworth, A. W., and Owenson, G. G. 1998. Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles* 2: 191–200.
- Kristiansen, J., and Kristiansen, Aa. (1999) A new species of *Chroomonas* (Cryptophyceae) living inside the submarine ikaite columns in the Ikkafjord, South-west Greenland, with remarks on its ultrastructure and ecology. *Nord J Bot* 19: 747–758.
- Llobet-Brossa, E., Ramon, R. M. and Rudolf, A. 1998. Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization *Appl. Environ Microbiol* 64: 2691 - 2696.
- Lucas, P. H., Webb, T., Valentine, P. S. and Marsh, H. 1997, The Outstanding Universal Value of the Great Barrier Reef World Heritage Area, Great Barrier Reef. Marine Park Authority, Townsville, Qld.

- Ludwig, J. A., and J. F. Reynold. 1988. Statistical Ecology. Wiley N. Y. p.85-103.
- Miller, D. N., J. E. Bryant, E. L. Madsen, and W. C. Ghiorse. (1999) Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment sample. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 4715-4724.
- Omura, S. 1992. *J. Ind. Microbiol.* 10: 135-156.
- Pratt, B. R. 1982. Stromatolitic framework of carbonate mudmounds. *J. Sediment. Petrol.* 52, 1203 – 1227.
- Pratt, B.R., 1995. The origin, biota and evolution of deep-water mud-mounds. In: Monty, C.L.V., Bosence, D.W.J., Bridges, P.H., Pratt, B.R. (Eds.), *Carbonate Mud-Mounds, Their Origin and Evolution*. Spec. Publ. Int. Assoc. Sedimentol., vol. 23, pp. 49– 123, Tulsa.
- Riding, R. 2002. Structure and composition of organic reefs and carbonate mud mounds: concepts and categories. *Earth-Science Reviews* 58: 163 – 231.
- Sørensen, M. V., and Kristensen, R. M. 2000. Marine rotifera from Ikka Fjord, SW Greenland. With a Description of a New Species from the Rare Mineral Ikaite. *Monographs on Greenland/Meddelelser om Grønland, Bioscience*, 51.
- Stougaard, P., Jørgensen, F. Johnsen, M. G. and Hansen, O.C. (2002) Microbial diversity in ikaite tufa columns: an alkaline, cold ecological niche in Greenland. *Environmental microbiology*. 4: 487–493.
- Takami, H., Akiba, T., Horikoshi, A., 1990. Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 519 – 523.
- Webb, G.E., 1996. Was Phanerozoic reef history controlled by the distribution of non-enzymatically secreted reef carbonates (microbial carbonates and biologically induced cement)? *Sedimentology* 43, 947– 971.