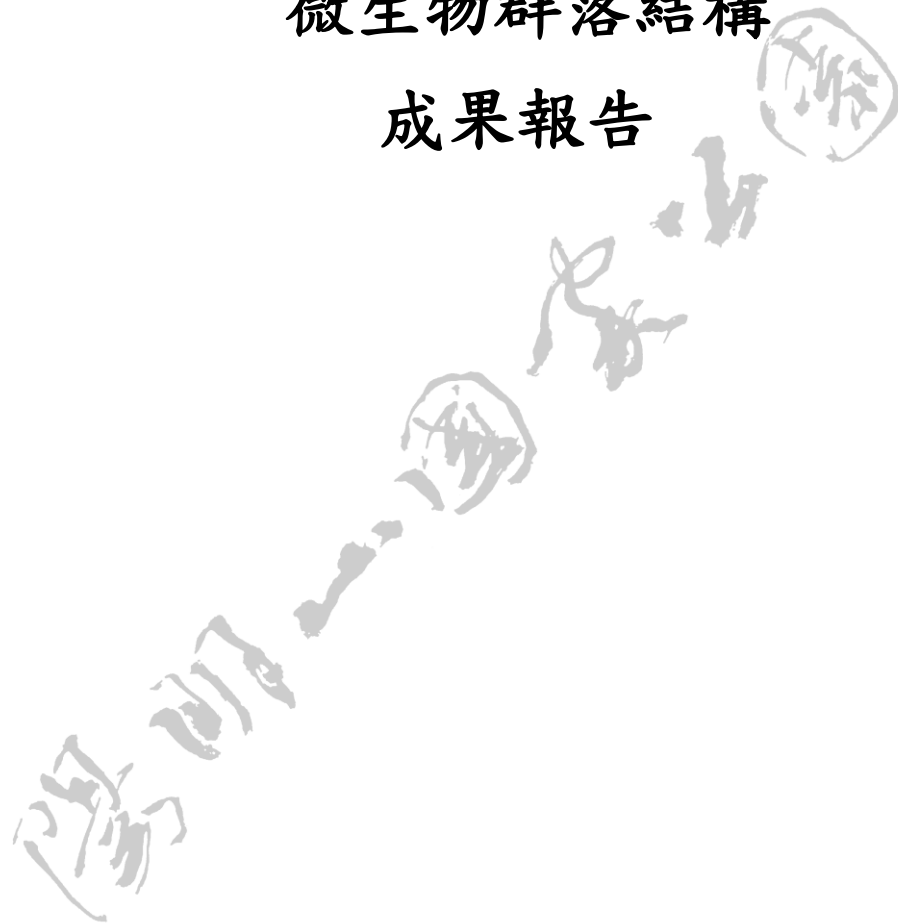


陽明山國家公園噴氣口及火山土壤微生物群落結構成果報告

陽明山國家公園管理處委託辦理報告(一〇七年度)



陽明山國家公園噴氣口及火山土壤
微生物群落結構
成果報告



陽明山國家公園管理處委託辦理報告

中華民國 107 年 12 月

陽明山國家公園噴氣口及火山土壤 微生物群落結構 成果報告

受委託單位：國立屏東科技大學

研究主持人：吳羽婷

協同主持人：林聖淇

研究期程：中華民國 107 年 4 月至 107 年 12 月

研究經費：新台幣 95 萬 5 千元整

陽明山國家公園管理處委託辦理報告

中華民國 107 年 12 月

卷之四

目次

圖目錄.....	III
表目錄.....	IV
摘要	V
Abstract.....	VII
第一章 緒論	1
第二章 材料與方法	3
一、試驗地區	3
二、噴氣口火山土壤及附近溫泉水採集	4
三、樣本微生物核酸萃取、16S rRNA 基因定序庫(amplicon library)建立與高通量定序	4
四、生物資訊及統計分析	5
五、火山土壤/溫泉水物理化學性質分析	6
六、火山土壤與溫泉菌種分離	12
七、研究架構	13
八、計畫作業進度	14
第三章 研究結果與討論	15
第一節 噴氣孔土壤與溫泉水物理化學性質	15
第二節 兩季噴氣孔土壤與溫泉水細菌群落組成與歧異度	25
第三節 兩季噴氣口與溫泉水細菌群落結構與環境變異	34
第四節 噴氣口土壤與溫泉水微生物分離培養	36
第四章 結論與建議	37
第一節 結論	38
第二節 建議	39
第五章 參考文獻	40
附錄一	43
附錄二	48

終
之
一
卷
終

圖目錄

圖 1 陽明山國家公園土綱土壤圖.....	1
圖 2 本計畫試驗地區.....	3
圖 3 2018 年 1 月至 12 月初的溫度及雨量變化圖.....	4
圖 4 現場噴氣孔溫度量測狀況.....	18
圖 5 現場溫泉水溫度量測狀況.....	24
圖 6 部分樣本溫泉菌 V6V8 擴增放大後的結果.....	25
圖 7 部分噴氣孔土壤細菌 V6V8 擴增放大後的結果.....	25
圖 8 分類層級為門之噴氣孔土壤及溫泉水細菌群落結構組成.....	26
圖 9 分類層級為綱之噴氣孔土壤及溫泉水細菌群落結構組成.....	27
圖 10 分類層級為屬之噴氣孔土壤及溫泉水細菌群落結構組成.....	27
圖 11 分類層級為種之噴氣孔土壤及溫泉水細菌群落結構組成.....	28
圖 12 分類層級為門之噴氣孔土壤及溫泉水細菌群落結構組成.....	28
圖 13 分類層級為綱之噴氣孔土壤及溫泉水細菌群落結構組成.....	29
圖 14 分類層級為屬之噴氣孔土壤及溫泉水細菌群落結構組成.....	29
圖 15 NMDS 分析第一季各樣區間細菌群落結構組成的相似性(OTU 的分類層級，相對豐富度>1%).....	31
圖 16 NMDS 分析第一季各樣區間細菌群落結構組成的相似性(屬的分類層級，相對豐富度>1%).....	31
圖 17 NMDS 分析兩季各樣區間細菌群落結構組成的相似性(種的分類層級，相對豐富度>1%).....	32
圖 18 熱點圖分析兩季各樣區間最優勢 50 種細菌群落的動態變化(種的分類層級，相對豐富度>1%).....	33
圖 19 多重變異分析兩季噴氣口土壤細菌群落結構與環境變異的關係.....	34
圖 20 多重變異分析兩季溫泉水細菌群落結構與環境變異的關係.....	35
圖 21 四礮坪溫泉水塗盤狀態(第一季).....	36
圖 22 噴氣孔土壤塗盤狀態(第一季).....	36
圖 23 噴氣孔土壤塗盤狀態(第二季).....	37
圖 24 溫泉水塗盤狀態(第二季).....	37

表目錄

表 1 採樣點座標.....	15
表 2 兩季採樣噴氣孔採樣點的土壤溫度(°C).....	18
表 3 兩季噴氣孔土壤風乾後的土壤含水率(%).....	19
表 4 兩季噴氣孔採樣點的土壤酸鹼值.....	19
表 5 兩季噴氣孔採樣點的土壤全氮含量(%).....	19
表 6 兩季噴氣孔採樣點的土壤有機質含量(%).....	20
表 7 兩季噴氣孔採樣點的土壤有機碳含量(%).....	20
表 8 兩季噴氣孔採樣點的土壤硫含量(%).....	21
表 9 兩季噴氣孔採樣點的土壤氨態氮含量(ppm).....	21
表 10 兩季噴氣孔採樣點的土壤硝酸態氮含量(ppm).....	21
表 11 第一季噴氣孔採樣點的土壤性質比較.....	22
表 12 第二季噴氣孔採樣點的土壤性質比較.....	22
表 13 兩季噴氣孔採樣點的土壤性質比較.....	22
表 14 噴氣孔的土壤粒徑比例.....	23
表 15 噴氣孔的土壤質地.....	23
表 16 兩季溫泉水的化學性質分析(mg L ⁻¹).....	24
表 17 第一季與第二季大油坑噴氣孔土壤及溫泉水細菌菌種豐度與歧異度.....	30
表 18 第一季與第二季大磺嘴噴氣孔土壤細菌菌種豐度與歧異度.....	30
表 19 第一季與第二季大磺嘴噴氣孔土壤細菌菌種豐度與歧異度.....	30
表 20 第一季與第二季小油坑噴氣孔土壤細菌菌種豐度與歧異度.....	30
表 21 第一季與第二季溫泉水細菌菌種豐度與歧異度.....	30
表 22 兩季噴氣口土壤與溫泉水細菌群落結構與環境變異的相關性.....	34
表 23 兩季噴氣口溫泉水細菌群落結構與環境變異的相關性.....	35

摘要

關鍵字：噴氣口、溫泉水、細菌群落組成、次世代定序、乾濕季

一、研究緣起

陽明山國家公園具有臺灣獨特的火山生態系，園區內仍有多處受到後火山作用形成噴氣口而造就特殊微環境，碳(C)和硫(S)循環是所有火山共同的生地質化學循環，微生物正是扮演著調控火山生態系元素循環重要的角色。陽明山國家公園火山土壤方面已完成多項研究調查工作，但仍未有針對噴氣口火山土壤微生物的相關研究。

二、研究方法及過程

選擇依海拔由低而高包括大磺嘴(200~250 m)、四磺坪(300~350 m)、大油坑(600 m)及小油坑(800 m)等四處為研究地。研究材料為隨機採集自仍有後火山作用的大磺嘴、四磺坪、大油坑及小油坑五處噴氣口土壤及周圍附近的一處溫泉水。應用次世代定序技術分析土樣及溫泉水的細菌群落結構，接著，此外，也進行土壤及溫泉水的物理化學性質分析及菌種分離培養。

三、重要發現

今年兩次採樣的時間點(四月及九月)剛好是今年陽明山國家公園降雨量的最低峰(乾季)及最高峰(濕季)，噴氣孔的土壤質地屬於砂質壤土、壤質砂土或砂土，其餘的土壤化學性質當季的四處樣點比較，只有四磺坪第一季的硝酸氮含量及第二季的有機質含量明顯比其他地區來的高，其餘沒有明顯差異。此外，同一個樣區兩季之間包括 pH 值、凱氏全氮及有機質有明顯變化。溫泉水化學性質第一季大磺嘴的氮含量明顯高於其他地區及同樣地點第二季的銨離子低於檢測值。pH 值與硫酸根離子含量四個地區乾季與濕季明顯有差異。

第一季所有噴氣孔土壤及溫泉水的細菌群落結構測到 86~1784 個 OTU；第二季則測到 892~2086 個 OTU。當季或是兩季之間四個採樣點的噴氣孔土壤及溫泉水細菌群落結構明顯有差異且第二季的物種豐度及歧異度都比第一季來的高。許多菌群的相對豐富度在乾濕季都有明顯的消長。兩季之間噴氣孔土壤細菌群落結構的變異明顯受到環境的有機質、雨量及土壤 pH 影響($P < 0.05$)而兩季之間溫泉水細菌群落結構變異則受到 NH_4^+ 有明顯的影響($P < 0.05$)。

四、主要建議事項

陽明山國家公園擁有台灣特殊的火山地形，境內多處仍有後火山作用而形成噴氣孔。噴氣孔產生大量的 SO_4^{2-} ，造就高溫強酸的特殊環境，因此也孕育許多耐高溫強酸的微生物包括細菌與古細菌。微生物主導著生態系重要的元素循環，因此要了解生地質化學必定要先清楚知道該生育地所孕

育的微生物。本年度計畫已順利分析四處噴氣孔多項環境因素及細菌群落結構，但是古細菌群落結構卻仍然未知，噴氣孔的特殊環境正是古細菌喜愛的生長條件。因此若能了解古細菌群落結構，勢必能使噴氣孔微生物群落結構的資訊更完整。長期建議，未來可以朝向環境宏觀基因體學 (metagenomes) 研究，讓火山噴氣孔生地質化學的循環資訊更精確完整。



Abstract

Keywords: fumarole, hot-spring water, bacterial community structure, next generation sequencing, wet and dry seasons

Yangmingshan National Park has Taiwan's unique volcanic ecosystem. There are still many fumaroles inside the park that are formed by the post-volcanic action and therefore creating a special micro-environment. Carbon (C) and sulfur (S) cycles are common biogeochemical cycles of all volcano ecosystem and microorganisms mainly play a vital important role in regulating the biogeochemical cycling of volcano ecosystem. The surveys on the geology and flora in Yangmingshan National Park have been well investigated, but the soil microorganisms that play an important role in the elemental cycling of volcano ecosystem are still far from known. Four study sites with representative fumaroles were selected along the elevation, including in Tahuangtsui (25° 08' N, 121° 31' E, elevation 200-250m), Sishuiping (25° 11' N, 121° 36' E, elevation 300-350m), Dayoukeng (25° 10' N, 121° 34' E, elevation 600m), and Xiaoyoukeng (25° 10' N, 121° 32' E, elevation 800m). Soil and hot spring water were randomly sampled from the fumaroles which still have post-volcanic action. Next-generation sequencing technique was applied to disentangle the bacterial community structure. In addition, we also analyzed the physicochemical properties of fumarole soil and hot spring water, and isolation of bacteria. The sampling time was in April and September this year, exactly with the lowest (dry season) and highest peak (wet season) of rainfall in Yangmingshan National Park. The soil texture of four fumaroles was categorized as sandy loam, loamy sand or sand. Only the content of soil nitrate nitrogen in season 1 and the soil organic matter content in season 2 of Sishuiping were significantly higher than other regions, and other samples had no significant difference. In addition, there was a significant change in pH, total nitrogen and organic matter between the two seasons in the same site. Chemical properties of hot-spring water from Tahuangtsui in season 1 had much higher total nitrogen than the other samples and ammonium ion content in season 2 of the same site are below the detection value. The pH value and sulfate ion content of the hot spring water were significantly different between the dry season and the wet season. In a total of 86 to 1784 OTUs were obtained in season 1 bacterial community structure of all fumaroles soil and hot spring water; in a total of 892 to 2086 OTUs were obtained in season 2 soil and water. The bacterial community structure of fumaroles soil and hot-spring water from four different study sites were significantly different on the same season or between two seasons. The species abundance and diversity index of all samples of season 2 were higher than the samples of season 1. The relative abundance of many bacteria has a significant decline in the dry and wet season. The variation of soil bacterial community structure in the fumarole between the two seasons was significantly affected by the environmental organic matter, rainfall and soil pH ($P < 0.05$) and the bacterial community structure variation of hot spring water between the two seasons was significantly affected by NH_4^+ ($P < 0.05$).

Yangmingshan National Park has Taiwan's unique volcanic ecosystem. There are many fumaroles formed by the post-volcanic action and generate a lot of SO_4^{2-} . Thus it becomes a specific microenvironment with extremely acids and high temperature. Therefore, it harbors many thermophilic and acidophilic microorganisms, including bacteria and archaea. Microorganisms mainly mediate vital important elemental

cycling in the ecosystem, so it is important to understand the microbial community structure prior to discover the biogeochemistry. We have successfully analyzed bacterial community structure and several environmental factors of fumaroles soil and hot-spring water in this project, but the archaeal community structure is still unknown.

For short-term strategies:

The extreme environment of the fumarole is the favorite growth condition of archaea. If we could further disentangle the archaea community structure, it will make the information of the microbial community more complete in Yangmingshan National Park.

For long-term strategies:

In the future, metagenomes are suggested as the next research strategy to make the information of biogeochemistry more complete.

中國美術史論叢書

第一章 緒論

地球上的火山分布並不均勻，近 75% 的活火山分布圍繞著環太平洋，也就是著名的「環太平洋火山帶」。臺灣剛好位於環太平洋火山帶上，根據文獻臺灣火山噴發約 280 萬年前已開始，直到約 20 萬年前才完全結束整個火山活動的歷史(林正洪等，2014)。如今本島上的火山活動已不活躍，僅剩北部大屯火山群及龜山島仍有火山活動的現象。大屯火山群坐落陽明山國家公園內，也因此以火山地質和地形著名，是臺灣唯一以火山群為主體的國家公園(內政部營建署，1994)。自火山噴發後，在氣象和地質因素的作用下造就不同地形，同時孕育出生物多樣性棲地。大屯山群主為火山岩母質，火山碎屑岩組成複雜且變化大，所化育而成的土壤性質受母質影響甚多，主要包括高鋁玄武岩、兩輝安山岩、含橄欖石兩輝安山岩、含角閃石兩輝安山岩、紫蘇輝石角閃安山岩及角閃石安山岩等六大類主要岩石所風化的土壤為主(陳正宏，1990)。蔡呈奇(2008)的研究報告指出大屯火山群的土壤化育時間相當長，至少經過 10 萬年以上，經過這麼長的時間土壤仍保有明顯的灰燼土形態特徵與強烈的火山灰特性是在世界火山灰土壤研究上極少見，因此造就陽明山國家公園內土壤有灰燼土(Andisols)與弱育土(Inceptisols)等兩種土綱(圖 1)，前者具有火山灰土壤的特性，富含鋁英石和腐植質鋁；後者化育程度較低 (Soil survey staff, 2014)。陽明山國家公園所擁有的火山土壤生態系是極具獨特性，因此是進行土壤與微生物生態相關研究的絕佳場域。

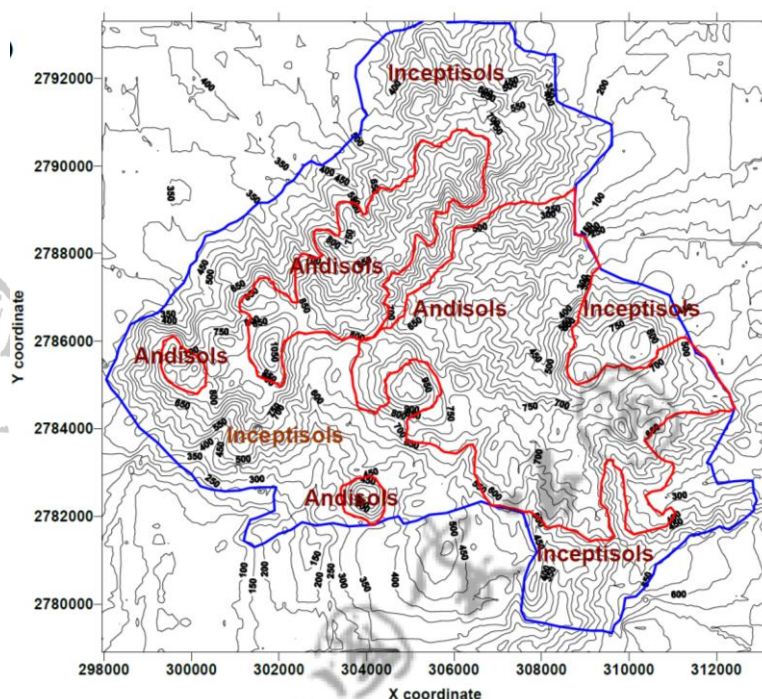


圖 1 陽明山國家公園土綱土壤圖(蔡呈奇，2008)

土壤微生物主導生態系功能中非常重要的生物地質化學循環，包括有機物的分解、元素循環和土壤發育(Balser and Firestone, 2005; Carney and Matson, 2005)。土壤富含大量的有機物，是全球主要

的碳儲存庫之一，其中有機物的分解和養分的循環主要是土壤微生物調控的重要生態過程(ecosystem process) (Brussaard, 1997; Freckman et al., 1997)。土壤細菌群落的結構組成主要包括群體如放線菌，革蘭氏陰性和革蘭氏陽性細菌的相應比例；這些微生物群體正是調控土壤特定元素循環過程的重要生態系成員(Vestal and White, 1989)。有報告指出，革蘭氏陰性菌和革蘭氏陽性菌比例上的改變對土壤碳消耗和其他養分循環有顯著影響(Kao-Kniffin and Balser, 2008)，其中革蘭氏陰性菌與土壤中的氮礦質化作用(nitrogen mineralization)密切相關(Schlegel, 1992; Fraterrigo, 2006)。土壤微生物如 *Arthrobacter* 和 *Streptomyces* 屬放線菌類，則具有固定金屬和降解有機污染物的重要細菌(Nostrand et al., 2007)。火山土壤生態系是不同於一般森林土壤生態系包括具極端環境因素例如高溫、強酸或強鹼、無氧等都是造就該生態系的極端特殊性。地球上許多極端環境都有研究證實微生物的存在如大氣中的平流層(Smith et al., 2009)、冰凍的北極圈(Siebert and Hirsch, 1988)和高海拔火山噴氣孔(Solon et al., 2018)。國外對於火山的土壤微生物相關研究已經非常普遍(Milkov et al., 2004; Niemann et al., 2006; Stott et al., 2008)，反觀國內也有一些有關泥火山的報告(Chen et al., 2004; Liu et al., 2011; Chang et al., 2012; Tsui et al., 2013)，但卻未有深入探討最具代表性的陽明山國家公園大屯火山土壤的微生物群落結構的研究。

近年來，陽明山國家公園境內植群地質相關研究已近完整，但是對於火山土壤元素循環扮演著極重要角色的微生物仍然是未知。搜尋所有陽明山國家公園相關研究計畫中，只有李重義(2004)及李重義(2006)是有關微生物的研究，分別是針對外雙溪流域和溫泉為研究樣區。對於土壤地下部分尚未有相關研究，而且以當時的技術只能分離培養菌種，這只能了解到菌相組成的一小部分，因為九成以上的菌都是無法人工培養的。近幾年，分子技術的快速發展，現今的技術已可分析環境中的完整微生物群落結構，進而了解其存在此特定生態系的功能。對於擁有特殊火山地質環境的陽明山國家公園而言，火山土壤必定孕育許多異於其他生態系的微生物。前人研究指出陽明山火山土壤呈極酸性(蔡呈奇等, 2008)，對於這種極端生育環境正是孕育特殊微生物的場域。

陽明山國家公園具有臺灣獨特的火山生態系，園區內仍有多處受到後火山作用形成噴氣口而造就特殊微環境，碳(C)和硫(S)循環是所有火山共同的生物地質化學循環，微生物正是扮演著調控火山生態系元素循環重要的角色。陽明山國家公園成立後持續積極推動生物資源及生態保育相關研究，火山土壤方面已完成多項研究調查工作(余炳盛, 2004; 顏江河, 2007; 蔡呈奇, 2008)，但仍未有針對噴氣口火山土壤微生物的相關研究，對於噴氣口火山土壤微生物的多樣性及功能仍未知，因此本研究計畫將針對噴氣口火山土壤及周圍溫泉水微生物進行探討。目標將應用高通量定序解開噴氣口火山土壤及溫泉水微生物的群落結構及菌群時間上的動態變化。結果可提供瞭解火山微生物的物種多樣性，進一步可找出活動火山指標性的菌群。本研究計畫目標包括 1. 分析噴氣口火山土壤及溫泉水物理化學性質。2. 分析噴氣口火山土壤及溫泉水微生物群落結構及與環境變異的關係。3. 比較不同噴氣口火山土壤及溫泉水菌群的差異並找出後火山作用指標性的菌群。4. 監測噴氣口火山土壤及溫泉水菌群

時間性的消長。

第二章 材料與方法

一、試驗地區

陽明山國家公園區內具有代表性之噴氣口主要有13處，為了兼顧不同海拔高度之微環境不同，選擇依海拔由低而高各為大磺嘴、四磺坪、大油坑及小油坑4處為研究地。硫磺谷位於紗帽山西南方，海拔200~250 m；四磺坪位於磺嘴山北側，海拔300~350 m；大油坑位於上磺溪橋上游400公尺，海拔600 m；小油坑位於七星山西北側之崩裂口，海拔800 m(圖2)。研究材料為採自仍有後火山作用的大磺嘴、四磺坪、大油坑及小油坑火山噴氣口及其周圍火山土壤和溫泉水。每個噴氣孔外觀型態多變因此土壤採樣的範圍及深度以取得足夠的土樣供分析為主。該地區2018年的雨量最低與最高峰分別出現在四月及九月(資料自中央氣象局取得)(圖3)。

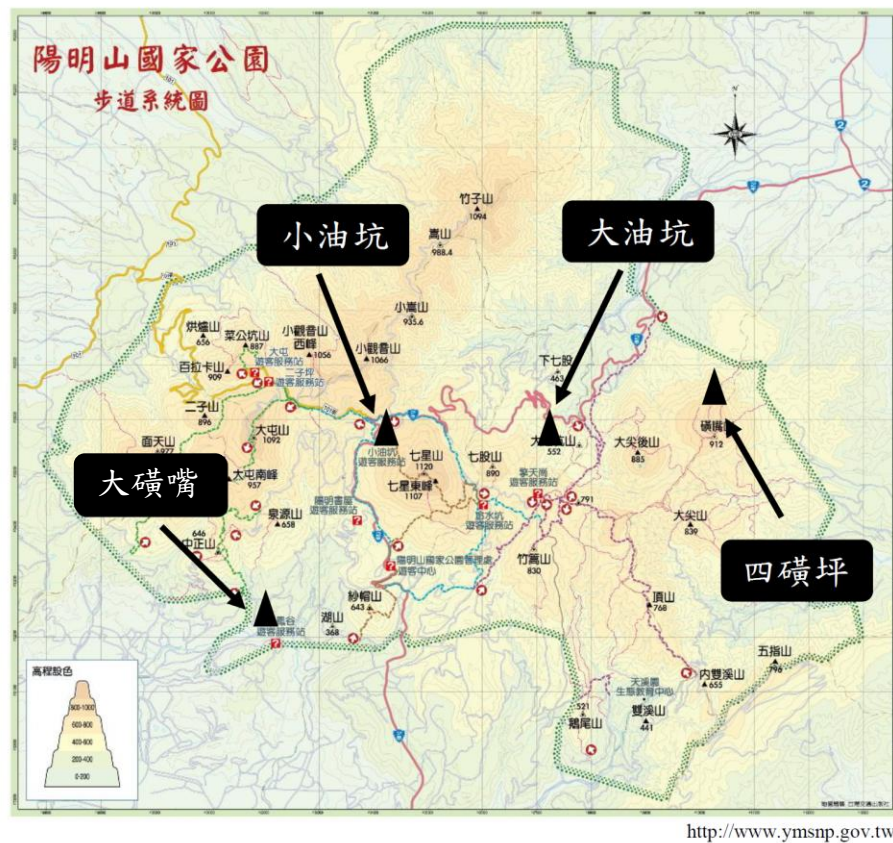


圖 2 本計畫試驗地區

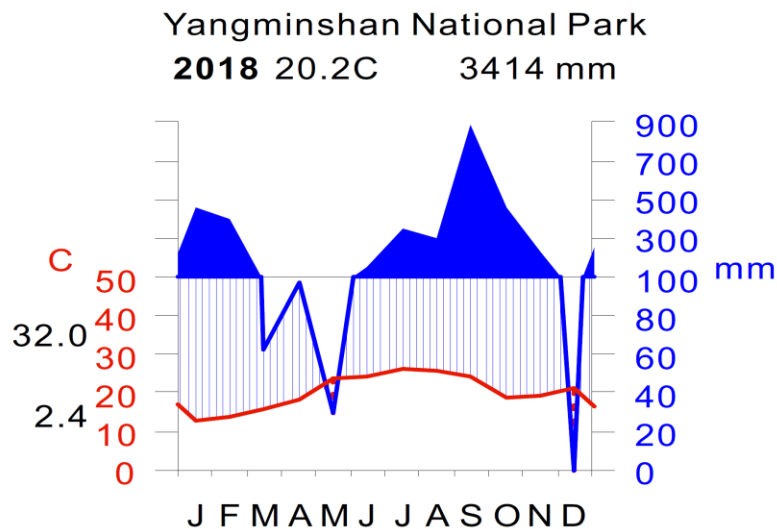


圖 3 2018 年 1 月至 12 月初的溫度及雨量變化圖

二、噴氣口火山土壤及附近溫泉水採集

在4個選定代表性噴氣口研究地區(即大磺嘴、四磺坪、小油坑及大油坑)每區隨機選取5個噴氣口先行土壤溫度量測後以採土器採集土壤。每個樣本採集之間，採土器確實清潔並噴拭75%酒精避免樣本間的污染。土壤過篩前取一部分保溫保存供後續分離菌種用。土壤過篩後，一部分裝袋供土壤性質分析用，置室溫保存;一部分放入無菌離心管立刻放入液態氮桶中後置乾冰保存冷凍低溫運送回屏科大森林系實驗室放置-20度冰櫃保存直至分析。溫泉水採集數公升帶回實驗室進行過濾後(<11 μ m)低溫高速離心集菌(12,000g, 40min)除去上清液後置於-20度保存。同時也另外採集一部分溫泉水供化學性質分析。本計畫實驗目的主要為比較不同季節採集的樣本，其溫度及雨量等氣候因素是否會影響菌相和土壤性質的結果。第一次採樣時間為107年4月27(春天)、28日;第二次為同年9月7、8日(秋天)。

三、樣本微生物核酸萃取、16S rRNA 基因定序庫(amplicon library)建立與高通量定序

土壤微生物核酸萃取使用 Quick-DNATM Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymoresearch, USA)，步驟依照 Kit 內 protocol 再加以修改，步驟如下:取大約 3 克的土樣加入 6 mL 的 1 倍 PBS 中，均質混合，再放入超音波清洗機中震盪 10 分鐘，4°C 離心 1000 g 3 分鐘，取上清液至新的離心管內，4°C 離心 12000 g 10 分鐘，去除上清液，用 200 μ L 的 1 倍 PBS 懸浮 pellet，之後依照套組中的方法繼續完成 DNA 萃取；溫泉水的微生物萃取步驟依照 Quick-DNATM Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymoresearch, USA) Kit 內 protocol 做法。萃取完成的核酸利用 NanoDrop ND-1000 分光光度計(Thermo Fisher

Scientific, Dreieich, Germany)檢測濃度和品質並將核酸萃取物存放於-20°C。細菌的群落組成分析分別依據 16S rRNA 基因上的 V6-V8 的高變異片段。使用 16S rRNA 基因通用的引子進行檢測，細菌使用的引子為 968F/ 1391R。PCR 反應總體積為 50 μ L，其中包含 25 μ L Taq Master Mix (Biauan)、2.5 μ L 20 mg/mL BSA、10.5 μ L 無菌水、每個引子 0.4 μ M 和 2-5 μ g 稀釋後的 DNA 模板(最終濃度為 100 ng)。PCR 反應程序：最初溫度 95°C，5min 其次是 95°C 裂解，30 sec；52°C 20sec 用於細菌 30 個循環；72°C 45 sec；最後以 72°C 延伸 10 min 並在 4°C 冷卻完成 PCR 擴增反應。PCR 的產物透過 1%之 Agarose 之洋菜瓊脂膠片電泳置於 1xTBE 緩衝液及 SYBR® Green 分離。從凝膠上切下預期大小的條帶（約 424bp），使用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)純化。使用 NanoDrop 分光光度計(Thermo Scientific, Vantaa, Finland)檢測純化的 DNA 品質後進行第二次 PCR。在第二次 PCR 過程中，所用的引子是帶有特定條碼，可以辨別來自不同樣本的序列。PCR 反應總體積為 50 μ L，含有 25 μ L Taq Master Mix (Biauan)、2.5 μ L 20 mg/mL BSA、10.5 μ L 無菌水，0.4 μ M 每種標記引子和 100ng V6-V8 擴增子。PCR 反應程序為：94°C 初始變性 3 min、94°C 20 sec、52°C 10 sec，72°C 30 sec，循環 20 次，最後一步 72°C 2 min，然後在 10°C 冷卻。第二次 PCR 產物切膠純化並檢測濃度，達到定序上機要求的濃度，即可送至 Genomics (Taipei, Taiwan)定序，此部分分析將採用次世代定序技術 Illumina MiSeq 2000 sequencing system (San Diego, USA)。

四、生物資訊及統計分析

為了得到質量較高、符合要求的有效序列，會將測序得到的原始序列進行過濾嵌合體和去除模糊鹼基(N)、錯配的引物、不完整的條形碼以及過短的序列。雙端序列使用 USEARCH (v8.0.1623) 系統內建設置合併成單一序列，然後使用 MOTHUR (v1.35.1)進行序列品質檢測，保留(1)鹼基對長度在 400-450 bp 之間 (2)均聚物 (homopolymer)不超過 8bp (3)沒有任何模糊鹼基 (4)平均質量評分大於 20。使用 UCHIME(在 USEARCH 軟體中執行)以參考模式及最小歧異度為 3%檢測並去除嵌合 16S rDNA 序列。使用 UPARSE 方法進一步分析已經過品質檢測和非嵌合序列(Edgar, 2013)產生樣本序列相似度為 97%的操作分類單位 (Operational Taxonomic Units, OTUs)。使用 USEARCH 全球比對於 Greengenes 13_5 基因庫中搜尋 OTU 序列最穩合的分類結果。後續結果統計分析所使用的分析軟體為 R 統計(Team RDC, 2011)(版本 1.17.2.4)，基於初步排序指數分析，使用 $\log(x+1)$ 變換豐度數據和 Bray-Curtis 相異係數計算所有樣本對之間的相異性，以獲得基於豐度的相異性矩陣，進一步比較不同處理中細菌群落組成的 α 以及 β 多樣性。使用 vegan 軟件包基於 Bray-Curtis 距離的 nmds 函數來執行非度量多維縮放(NMDS)分析以可視化樣本間細菌群落的分佈及 envfit 以確定對細菌群落組成影響最大環境變數。另外，使用軟件 pheatmap 來檢視不同樣本間特定細菌群落在時間上的動態變化。

五、火山土壤/溫泉水物理化學性質分析

土壤樣本及水樣帶回屏科大森林系實驗室分析，分析項目包括土壤溫度(採樣現場量測)、土壤質地(Gee and Bauder, 1986)、土壤/溫泉水樣酸鹼值(Mc Lean, 1982)、土壤凱氏全氮(Semimacro Kjeldahl method) (MacDonald, 1977)、土壤有機質(Walkley-Black procedure) (Nelson and Sommers, 1996)、溫泉水樣全氮、土壤/溫泉水樣無機氮及硫分析(Bremner, 1965)。詳細方法如下：



(一) 土壤質地分析

材料

鮑氏(液體)比重計測定法

Bouyoucos 氏比重計，讀數為 0~60 單位(g/l)、電動攪拌器：速率 9000 rpm、600mL 攪拌杯、玻璃筒：直徑 2.5 吋，筒高 18 吋，有兩刻度線，上一刻度線之容積為 1100mL，下一刻度線之容積為 1050 mL、10%偏磷酸鈉(Sodium metaphosphate, $(\text{Na}_6(\text{PO}_3)_6)$ 溶液。

方法

1. 秤取一定量土壤（通過孔徑 2mm 土篩者），砂土用 100g，其他土壤用 50g，秤量以烘乾土重計算。
2. 將秤取土壤放入攪拌杯，加蒸餾水 300ml 和 10ml 偏磷酸鈉溶液，放置 10 分鐘（固結土壤者 20 分）使水分充分浸入於土壤內，以利土壤分散。
3. 置於電動攪拌器中，予以攪拌，砂土 5 分鐘，其他土壤 10 分鐘。
4. 把分散後的懸浮體全部傾入玻璃筒內，並以少量之水吹洗金屬杯內之殘餘物，使其全部洗入玻璃筒中。
5. 如所用之土壤樣品為 50 克，則加蒸餾水至 1050 mL 之刻度線，如所用之土壤樣品為 100 克，則加蒸餾水至 1100 mL 之刻度線。
6. 以攪拌槳上下攪拌均勻，迅速取出，並立即記錄開始靜置的時間（最好用碼錶 Stop watch）。至靜置後 20 秒鐘，輕輕插入液體比重計（Bouyoucos hydrometer，單位為克／公升），不使其上下振動，至靜置後 40 秒鐘時，記錄比重計上與液面相接觸處之數值（PS），此數值（PS）為粘粒與粉粒之含量。
7. 輕輕取出比重計，慎勿搖動玻璃筒，至靜置後 2 小時，再插入比重計，並記錄比重計上與液面相接觸處之數值（PC），此數值（PC）為粘粒之量。

(二)土壤 pH 值測定

前言

將玻璃電極(Glass electrode method)與基準電極(Calomel half-cell)插入供試液中時，即形成一種化學電池，其電動勢即兩極間的電壓(E)與供試液中的 pH 有如下之關係：

$$\text{pH} = \frac{E - \text{常數}}{\text{常數} \times (273 + \text{供試溫度}^{\circ}\text{C})}$$

根據化學上的定義，水分子可解離為氫離子與氫氧離子，亦即 $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{OH}^-$ ，在 22°C 下水的解離常數 $K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = 10^{-14}$ ，所以任何水在 22°C 時 $[\text{H}^+] = [\text{OH}^-] = 10^{-7}$ 為中性。上式兩邊皆除 1 並以對數表示之

$$\log \frac{1}{K_w} = \log \frac{1}{[\text{H}^+]} + \log \frac{1}{[\text{OH}^-]} = 14$$

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

$$\text{pOH} = -\log [\text{OH}^-]$$

材料

玻璃電極 pH 計(Glass electrode pH meter)、50ml 玻璃燒杯或塑膠杯、玻璃棒、pH 4 及 pH7 之緩衝標準液、

方法

1. 稱經 2 mm 篩網篩過的土壤 20 g 置於 50 ml 的塑膠杯中，加入 20 mL 的蒸餾水，並以玻璃棒充分攪拌之。
2. 放置一小時，並間斷予以攪拌 2 次，即可用 pH 計測定其 pH 值，在插入電極前再予以充份攪拌。
3. 在測定土壤 pH 值前，先以 pH4 及 pH7 之緩衝液校正 pH 計。
4. 測定多量樣本時，每測 10 個未知 pH 之土壤樣本，應加一個對照樣本(Check sample)，即已知其 pH 值者，若對照樣本之 pH 有改變時，應再以標準緩衝液校正之。
5. 在測定土壤 pH 時，讀記數至小數第一位即可。

(三)溫泉水 pH 值測定

溫泉水經 $0.45 \mu\text{m}$ 濾膜過濾後，取濾液直接以 pH 計量測。

(四)土壤全氮量測定

原理

土壤中氮素之存在幾乎全屬有機態，利用濃硫酸及少量分解促進劑，進行高溫處理，其中有機質全部消失，氮素則全變為氨態氮 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$)，主為 NH_4HSO_4 及 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。土壤中原存之硝酸態氮 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) 並未變成氨態氮，但其數量極微，可以忽略不計。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 可用 NaOH 使之變為 NH_3 而逸出，再利用 H_3BO_3 以吸收逸出之 NH_3 ，再利用標準酸液滴定之，以 Tachiro's indicator 做指示劑，其終點為桃紅色。由標準酸液之消耗量即可計算出氮量。

材料

100 mL 凱氏分解瓶，分解爐，蒸餾裝置，100 mL 燒杯，電爐。

藥品: 1. 分解促進劑 Na_2SO_4 (or K_2SO_4)， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

2. 濃硫酸(比重1.84)

3. 40% NaOH

4. 2% H_3BO_3

5. 0.1N H_2SO_4 標準液，須經過標定其正確之規定濃度

6. Tachiro's indicator 秤取0.166g methyl blue 及 0.25g methyl red用95%乙醇溶解後稀釋至200mL。

方法

1. 樣品之分解

秤取1g風乾土放入100 mL 凱氏分解瓶中，加入1g Na_2SO_4 及0.1g CuSO_4 ，次加 8 mL

濃硫酸，搖勻置於分解爐上加熱分解，經4小時至分解液呈淡青色為止，另取一個分解瓶不加土壤，僅加濃硫酸和分解促進劑做空白試驗。

2. 蒸餾

a. 將分解瓶套在蒸餾裝置上，開電爐使蒸氣通入分解瓶內以煮開 NH_4^+ ，再將25~30 mL之40% NaOH 倒入分解瓶，直至溶液呈灰黑色。

b. 取20 mL之2% H_3BO_3 裝於100 mL 燒杯，加入1~2滴Tachiro's指示劑置於接收管底端。

c. 經加熱蒸餾出來的 NH_3 ，即由2% H_3BO_3 溶液吸收，溶液由桃紅色變為黃色，愈鹼顏色愈深，直至加熱蒸餾而滴入燒杯的水達到60mL為止。

3. 滴定

被 NH_3 中和後的黃色硼酸液，再由0.1N H_2SO_4 反滴定至呈現桃紅色為止，即可知土壤全氮量。

結果

計算公式

$$\text{N}\% = (\text{樣本耗用硫酸量} - \text{空白耗用硫酸}) \text{ mL} \times \text{N} (\text{滴定用之硫酸克當量}) \times 14$$

$$\div \text{樣本重量} \times 100\%$$

補充資料

1. Na_2SO_4 (or K_2SO_4)提高硝化溫度
2. Se、Hg or Cu 促進有機質之氧化作用
3. 酸鹼定量間標準液之配製

a. 0.1N - Na_2CO_3 標準液的配製：

秤取5.303g Na_2CO_3 溶解於水配成1升，即得0.1N標準液。

b. 0.1N - H_2SO_4 標準液的配製：

約取純濃硫酸3mL，稀釋為1升，即為ca 0.1N - H_2SO_4 。

4. 酸鹼定量用標準液之標定

以 0.1N - Na_2CO_3 標準液標定 ca 0.1N - H_2SO_4 ：滴管內盛 0.1N - H_2SO_4 ，另備三角瓶一支，用吸管吸取 25mL之0.1N - Na_2CO_3 流入瓶中，加水75mL，使全量為100mL，添加甲基橙(methyl orange)1~2滴，以 H_2SO_4 滴定之，此操作至少

須

重複二次，並以一空白實驗同時並行之，即 25mL Na_2CO_3 以蒸餾水代之，其

餘

與上操作同。

5. 結果計算

(滴定 Na_2CO_3 所用 H_2SO_4 的mL數－空白滴定所用 H_2SO_4 的mL數) $\times$ x

$$= 0.1 \times 25$$

$$x = \text{H}_2\text{SO}_4 \text{的濃度(N)}$$

(五)土壤有機質測定

原理：利用 $K_2Cr_2O_7$ 及 H_2SO_4 之混合液將有機物氧化，未耗用掉的 $K_2Cr_2O_7$ 以 $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 滴定，據以計算有機碳含量。此方法未供應外部熱能，僅於重鉻酸鉀及硫酸混合時有熱能產生，因此，僅能氧化容易氧化的有機碳，有機質的估算是以其重的 58% 為有機碳估值計算之。

材料：

1. $K_2Cr_2O_7$ 溶液(1.0 N)：溶解 49.04 g 試藥級 $K_2Cr_2O_7$ (以 $105^\circ C$ 烘乾 2hr)於水中，稀釋至 1 升。
2. $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ (0.2 N)：溶 78.44 g 試藥級 $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 於含 20 ml 濃硫酸的 300 ml 水中，冷卻後稀釋至 1 升。混合均勻，保存於密閉容器內。
3. 指示劑：Ortho-phenanthroline ferrous sulfate (0.025 M)，有商業產品，名為 Ferroin；直接使用。
4. 濃硫酸：不低於 96%，比重為 1.84。

方法：

1. 研磨 5 g 的 2 mm 土樣，使之通過 35 mesh 篩網。
2. 秤取上述土樣 0.50 g(有機層及有機土較少，砂土約 2.0 g)置於 500 mL 角錐瓶內。
3. 加入 10 ml 重鉻酸鉀液，注意避免土壤顆粒濺出；輕緩搖晃之。加入 20 ml 濃硫酸。
4. 立即置於沙盤中，於 $105^\circ C$ 加熱 10 分鐘。
5. 冷卻後加入 150 mL 水及 85% H_3PO_4 10 mL。再加入 5-6 滴指示劑(Ferroin)。
6. 在電磁攪拌器上以硫酸亞鐵液滴定之，初時顏色應為暗褐色，然後轉成淺綠色，再變成暗綠色；此時應緩慢加入滴定液，反應終點時，顏色會迅速由藍綠色轉為褐紅色。

計算：

$$C\% = N \times (V_1 - V_2) \times 12/4000 \times 100/\text{土樣重(g)}$$

N, 硫酸亞鐵之濃度， V_1 =空白樣本所用硫酸亞鐵溶液量， V_2 =樣本所用硫酸亞鐵溶液量(mL)，12/4000 為 C 之毫克當量。

有機質% = $C\% \times 1.724$ (1.724 是以假設有機物中含有 58% 的碳而算得)

(六) 土壤硫及無機氮分析

土壤硫含量先取 3 mg 土壤包至錫盒內，再以 CHNS 元素分析儀(CHNS-Elemental Analyzer, EA, elemental vario EL)分析。土壤無機氮含量取 10 g 土壤於 150ml 錐形瓶內，加入 50 mL 之 2M KCl 溶液，置於振盪器上震盪 1 小時，再用 Whatman 42 號濾紙抽氣過濾，並收集濾液，濾液可儲存於 4°C 冰箱備用。吸取 10 mL 土壤濾液於消化管內，加入 0.2 g 之 MgO，將消化管放置於凱氏氮蒸餾機內的蒸餾端，接收端放置含 10 mL 2% 硼酸及 2 滴 Tachiro's 指示劑的燒杯，加熱蒸餾，使蒸餾體積至 30 mL 中止。接著以 0.005N H₂SO₄ 滴定，測定餾出液中無機氮之 NH₄⁺-N 含量 (1 mL 0.005N H₂SO₄ = 70 μg NH₄⁺-N)。吸取 1 mL 土壤濾液以 COD 多功能水質分析儀(Photolab S12, WTW)分析樣本中的無機氮之 NO₃⁻-N 含量。

$$\text{土壤無機氮 (ppm)} = (A-B) \times 0.07 f \times 100 / \text{土壤樣品重(g)} \times 1000 / \text{濾液(mL)} \times k$$

A=樣品之硫酸滴定量(mL)

B=空白組測定硫酸滴定量(mL)

f=標準硫酸液之當量濃度

k=含水率

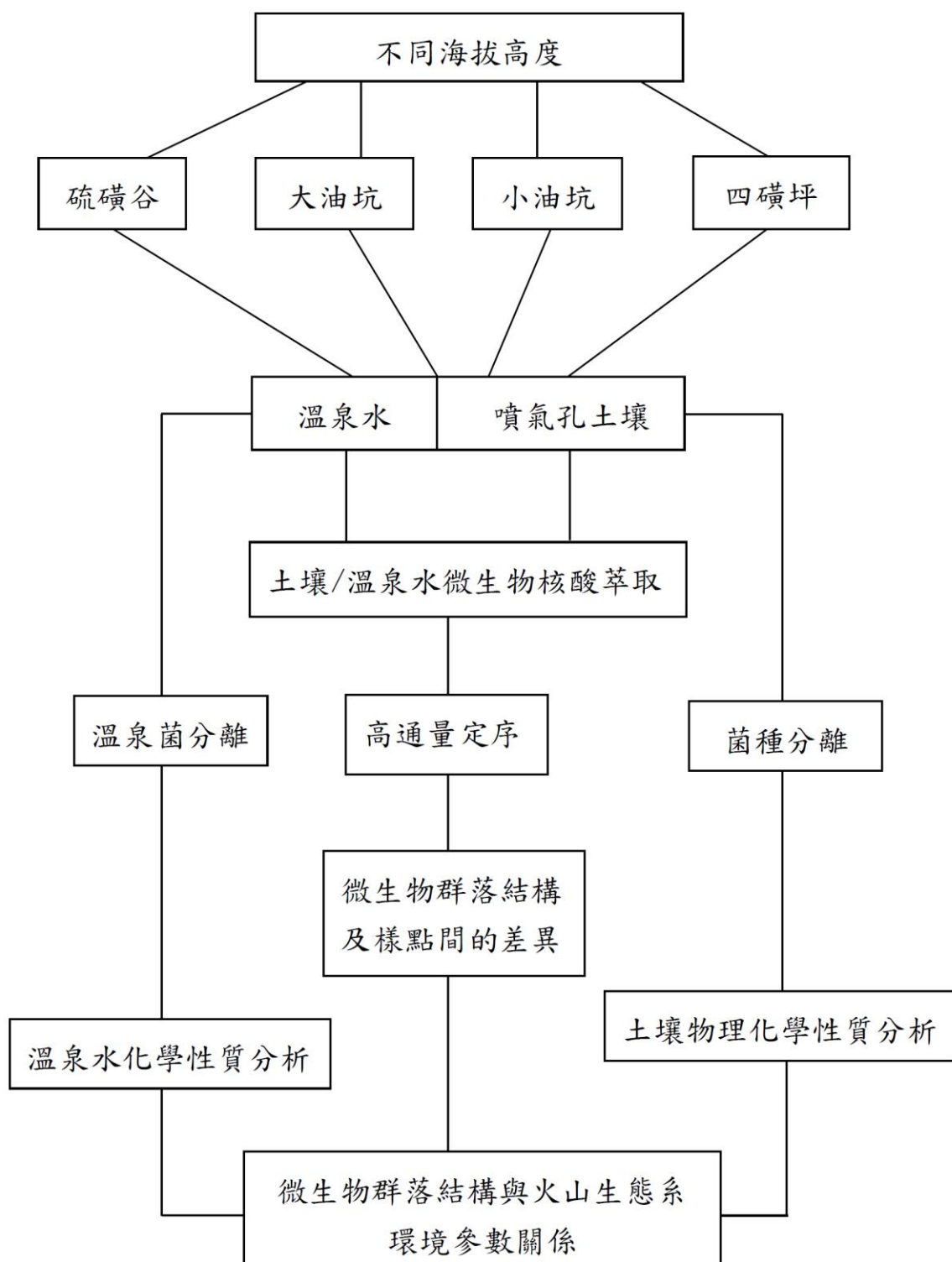
(七) 溫泉水樣全氮、無機氮及硫分析

溫泉水經過 0.45 μm 濾膜過濾後的濾液直接分析，以 COD 多功能水質分析儀(Photolab S12, WTW)分析樣本中的全氮及無機氮包括 NH₄⁺、NO₃⁻及 NO₂⁻。水樣硫酸根含量根據 USEPA method 375.4 分析。

六、火山土壤與溫泉菌種分離

噴氣孔土壤與溫泉水保溫當天帶回實驗室後立刻塗佈於 R2A agar (Merck)及溫泉水為基礎配成的培養基，其中添加 gellan (Phytigel-Sigma)及 2 g l⁻¹ MgCl₂·6H₂O 取代洋菜膠外，也可提供 chemotrophic microbes 能量來源 (Stott et al., 2008)。將培養皿放置密封培養缸並打入約 5-10% V/V CO₂，一部分置一般氧氣濃度下，於 60°C 生長箱觀察，經過多次純化後的菌落再進行菌種鑑定。

七、研究架構



八、計畫作業進度

	計畫作業進度									
研究項目/ 月份	3 月	4 月	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月
土壤/溫泉水採樣		■					■			
土壤/溫泉水 微生物核酸萃取		■	■				■			
amplicon libraries 建立與高通量定序			■	■			■	■		
土壤物理化學性質分析 溫泉水化學性質		■	■	■	■	■	■	■	■	■
序列及數據分析					■	■	■	■	■	■

執行情形

1. 預期不同海拔噴氣口火山土壤細菌群落結構有差異，且一年之內有時間性的動態變化。
2. 找出重要噴氣口之指標性菌群。

第三章 研究結果與討論

第一節 噴氣孔土壤與溫泉水物理化學性質

一、採樣點座標

第一季採樣於 4 月 27、28 日完成，四個地點共採集 20 個噴氣孔土壤樣本及 4 個溫泉水樣。採樣點座標如下(表 1)。第二季採樣於 9 月 7、8 日完成，採樣過程依下表座標盡量找到第一次採樣的同一處或是附近的噴氣孔進行第二次採樣。附上照片說明採樣過程及樣本處理情況。

表 1 採樣點座標

採樣地點	噴氣孔	X 座標	Y 座標
大油坑	1	330640	2794663
	2	330585	2794539
	3	330584	2794632
	4	330584	2794693
	5	330639	2794786
小油坑	1	327385	2801044
	2	327274	2800982
	3	327078	2801042
	4	327300	2801228
	5	328313	2800188
四礮坪	1	334247	2795023
	2	334191	2795115
	3	334331	2795116
	4	334275	2795085
	5	334387	2795116
大礮嘴	1	324558	2801459
	2	323584	2800654
	3	324001	2801117
	4	324477	2800935
	5	324614	2801398



107/04/27 以採土器採集噴氣孔土壤



107/04/27 土壤樣本泡液態氮降溫保存



107/04/27 分裝菌相分析土壤



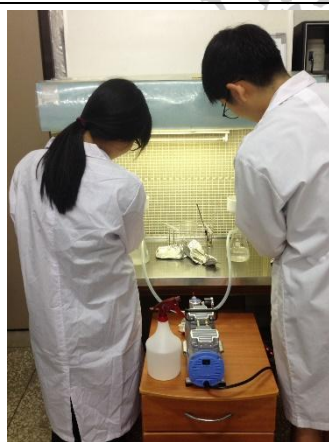
107/04/27 採集噴氣孔土壤



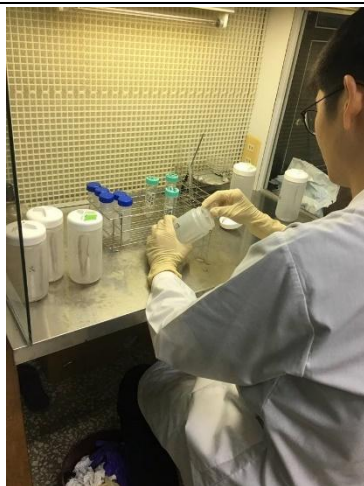
107/05/31 補採溫泉水樣本



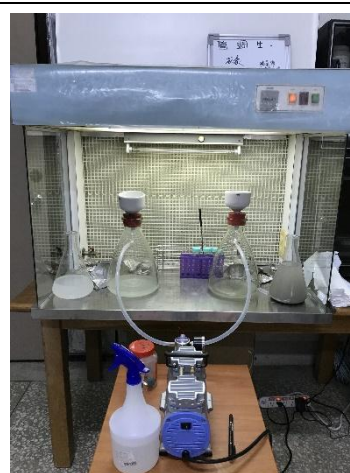
107/04/27 溫泉水過濾



107/04/27 溫泉水過濾



107/04/27 收集溫泉水菌



107/04/27 溫泉水過濾裝置



107/9/7 培養土壤菌種



107/9/7 土壤樣本分裝



107/9/7 土壤樣本分裝



107/9/7 分離培養土壤內菌種



107/9/7 測量噴氣口土壤溫度



107/9/7 測量溫泉水溫度



107/9/7 採集溫泉水-分析 SO_4^{2-}

二、噴氣孔的土壤溫度

現場採樣的土壤溫度量測現況如圖 4，結果如表 2。第一季所有採集的噴氣孔溫度介於攝氏 67.8 至 99.3 度之間(表 2);第二季則介於攝氏 52.3 至 99 度之間。同一採樣點溫度有落差，推測與所選的噴氣孔大小有關，例如大油坑，大多數噴氣孔巨大且噴出的高溫蒸氣較劇烈難接近，因此選了大油坑噴氣孔 5，屬於噴氣孔較小，因此溫度較低。兩季的噴氣孔溫度整體看來第二季比第一季稍微低一點，推測可能是下雨的緣故。第二季採樣時間點前後適逢下雨時期，當天採樣時也正下雨。



圖 4 現場噴氣孔溫度量測狀況

表 2 兩季採樣噴氣孔採樣點的土壤溫度(°C)

噴氣孔	大磺嘴		大油坑		小油坑		四磺坪	
	s1	s2	s1	s2	s1	s2	s1	s2
1	98.6	98.3	98.3	95.1	90.3	95	87.8	83.6
2	99.3	98.3	97.9	98.2	96.9	57.2	90.4	98.0
3	94.3	52.3	98.3	92.9	95.8	78.3	82.8	93.0
4	96.6	81.5	98.4	94.0	95.7	93.8	74.2	89.4
5	93.8	99.0	67.8	87.7	92.4	78	95.4	82.0
s1 : season 1 ; s2 : season 2								

三、噴氣孔的土壤含水率

兩季採樣適逢下雨，因此許多樣本含水量很高，帶回實驗室後先行自然風乾後過篩(< 2mm)，所量測的土壤含水率(%)如表 3。由於採集的每個樣本含水量不一定，因此放置風乾的時間也不一定，才會有前後兩季的含水量有差異。

表 3 兩季噴氣孔土壤風乾後的土壤含水率(%)

噴氣孔	大礮嘴		大油坑		小油坑		四礮坪	
	s1	s2	s1	s2	s1	s2	s1	s2
1	23.2±0.1	31.36±0.0	10.9±0.2	7.29±0.1	18.9±0.2	33.40±0.3	15.6±0.3	19.63±0.5
2	26.1±0.2	29.70±0.1	29.2±0.3	14.88±0.2	34.7±0.4	25.70±0.1	24.4±0.0	21.15±0.1
3	24.2±0.1	29.38±0.0	18.8±0.2	19.76±0.3	31.2±0.1	29.10±0.2	29.0±0.1	8.04±0.3
4	19.3±1.5	10.44±0.1	15.9±0.3	24.96±0.4	17.0±0.2	18.82±0.0	18.1±0.2	12.84±0.1
5	13.5±0.2	27.16±0.0	31.7±0.4	9.96±0.1	23.9±0.5	13.27±0.4	17.6±0.1	19.39±0.2
s1 : season 1 ; s2 : season 2								

四、噴氣孔的土壤酸鹼值

陽明山的噴氣孔土壤 pH 值非常低，第一季土壤介於 0.83-2.36；第二季土壤介於 0.88-2.27 (表 4)，兩季的 pH 無明顯差異。整理的 pH 值與前人所量測的噴氣孔周邊的裸地土壤相比，酸鹼值明顯更低(平均 3.06)(顏江河等，2013)。與世界其他火山噴氣孔相比也都較低，包括位於智利境內海拔最高的噴氣孔(4.4-4.5) (Schmidt et al., 2018)及位於南極的噴氣孔(6.7-7.4) (Bendia et al., 2018)。

表 4 兩季噴氣孔採樣點的土壤酸鹼值

噴氣孔	大礮嘴		大油坑		小油坑		四礮坪	
	s1	s2	s1	s2	s1	s2	s1	s2
1	1.37±0.01	0.95±0.00	1.22±0.00	1.74±0.00	1.29±0.01	1.03±0.00	1.58±0.01	1.38±0.01
2	1.36±0.01	1.09±0.01	1.29±0.01	1.61±0.00	1.65±0.00	2.27±0.01	1.05±0.01	1.44±0.03
3	1.88±0.01	1.18±0.01	1.83±0.01	1.54±0.00	1.04±0.01	1.08±0.00	0.96±0.01	2.05±0.00
4	1.40±0.00	1.14±0.01	1.08±0.01	1.57±0.01	1.10±0.01	2.15±0.01	1.08±0.01	1.85±0.01
5	1.41±0.00	0.99±0.01	0.83±0.01	1.60±0.00	2.36±0.00	0.88±0.00	1.32±0.03	1.37±0.01
s1 : season 1 ; s2 : season 2								

五、噴氣孔的土壤全氮含量(%)

陽明山噴氣孔土壤的全氮量介於 0.05-1.87% (表 5)，與 11 年前前人所量測的相同地點的噴氣孔周邊的裸地土壤相比，除了小油坑外，數值都來的比較高(0.05-0.06%)。小油坑周邊裸地土壤前人所測得是 1.11%，比起噴氣孔土壤來的高許多(顏江河，2007)。與智利高海拔(5824m)的火山噴氣孔全氮量相比則來的高許多(0.014-0.03%)。

表 5 兩季噴氣孔採樣點的土壤全氮含量(%)

噴氣孔	大礮嘴		大油坑		小油坑		四礮坪	
	s1	s2	s1	s2	s1	s2	s1	s2
1	0.13±0.02	0.09±0.00	0.20±0.04	1.87±0.47	0.19±0.02	0.05±0.01	0.28±0.03	0.25±0.02
2	0.09±0.02	0.11±0.02	0.09±0.00	0.09±0.00	0.07±0.02	0.07±0.02	0.11±0.03	0.19±0.02
3	0.13±0.02	0.11±0.02	0.16±0.02	0.07±0.00	0.12±0.01	0.09±0.03	0.08±0.02	0.52±0.05
4	0.09±0.02	0.16±0.04	0.28±0.03	0.07±0.02	0.13±0.03	0.07±0.00	0.15±0.00	0.27±0.03
5	0.13±0.03	0.05±0.00	0.10±0.01	0.17±0.04	0.15±0.02	0.20±0.00	0.13±0.03	0.25±0.02
s1 : season 1 ; s2 : season 2								

六、噴氣孔的土壤有機質含量

陽明山噴氣孔第一季土壤的有機質含量介於 2.38-11.65%；第二季土壤的有機質含量介於 0.35-8.18% (表 6)。4 個地點的 5 處噴氣孔整體的有機質含量第二季普遍降低，推測可能是雨水較多造成有機質流失。不過，與前人所量測相同地點的噴氣孔周邊的裸地土壤相比，數值仍都來的比較高 (0.21-1.14%)(顏江河, 2007)。兩季的土樣有機質含量若換算成有機碳(%)大約介於 0.21-6.76%(表 7)，其中只有第二季的 3 個噴氣孔低於 1%，因此與其他國家如智利高海拔(5824m)的火山噴氣孔 (0.13-0.36%)相比是非常高(Schmidt et al., 2018)。

表 6 兩季噴氣孔採樣點的土壤有機質含量(%)

噴氣孔	大礮嘴		大油坑		小油坑		四礮坪	
	s1	s2	s1	s2	s1	s2	s1	s2
1	6.27±0.09	3.64±0.46	6.52±0.16	5.91±0.38	7.33±0.53	2.51±0.20	7.18±0.26	8.18±0.65
2	5.63±0.30	4.06±0.36	4.39±0.14	5.10±0.38	2.38±0.19	3.28±0.02	11.59±0.46	3.73±0.11
3	4.24±0.37	1.53±0.11	7.74±0.56	1.21±0.24	3.52±0.09	3.27±0.37	5.97±0.02	7.38±0.28
4	5.79±0.42	4.35±0.11	4.40±0.26	0.35±0.24	11.65±0.34	2.56±0.17	7.69±0.17	6.22±0.15
5	6.53±0.46	4.46±0.64	4.12±0.12	3.65±0.24	4.99±0.59	1.89±0.26	9.10±0.53	6.36±0.46
s1 : season 1 ; s2 : season 2								

表 7 兩季噴氣孔採樣點的土壤有機碳含量(%)

噴氣孔	大礮嘴		大油坑		小油坑		四礮坪	
	s1	s2	s1	s2	s1	s2	s1	s2
1	3.64±0.05	2.11±0.26	3.78±0.09	3.43±0.22	4.25±0.30	1.45±0.12	4.17±0.15	4.75±0.38
2	3.27±0.17	2.35±0.21	2.55±0.08	2.96±0.22	1.38±0.11	1.90±0.01	6.72±0.27	2.16±0.06
3	2.46±0.22	0.89±0.06	4.49±0.32	0.70±0.14	2.04±0.05	1.90±0.22	4.06±0.92	4.28±0.16
4	3.36±0.25	2.53±0.06	2.55±0.15	0.20±0.01	6.76±0.20	1.49±0.10	5.30±0.39	3.61±0.08
5	3.79±0.27	2.59±0.37	2.39±0.07	2.11±0.14	2.89±0.34	1.10±0.15	5.28±0.31	3.69±0.26
s1 : season 1 ; s2 : season 2								

七、噴氣孔的土壤硫含量

陽明山噴氣孔的硫成分相當豐富，採樣過程中隨處明顯易見硫磺結晶，同地點不同噴氣孔之間的硫含量不盡相同推測與噴氣孔大小及排出的硫氣量有關。整理來說，四個地點以大油坑處的噴氣孔硫含量最高，因為兩季樣本中各有兩個樣本超過檢測儀器的最高標準(>100%)(表 8)。其次是大磺嘴(平均 48.53%)、四磺坪(平均 44.74%)及小油坑(平均 29.85%)。此外，第二季土壤樣本各採樣點平均硫含量也明顯減少。與其他土壤樣本相比，噴氣孔的硫含量極高，例如磺嘴山生態保護區所採的土壤 S 含量平均大約是 2900 mg kg⁻¹(本研究，約 0.29%); 日本中部一處火山土壤 S 含量平均大約 626-1086 mg kg⁻¹(約 0.06-0.1%)(Tanikawa et al., 2013)。

表 8 兩季噴氣孔採樣點的土壤硫含量(%)

噴氣孔	大磺嘴		大油坑		小油坑		四磺坪	
	s1	s2	s1	s2	s1	s2	s1	s2
1	66.64±3.84	40.41±1.25	-	-	40.14±1.68	6.56±0.68	28.06±0.94	89.39±0.48
2	45.29±2.04	31.76±0.56	23.31±0.50	-	4.02±0.47	19.23±0.87	74.16±3.87	28.32±0.93
3	11.48±0.07	7.89±0.07	-	4.35±0.00	5.97±0.18	27.01±1.39	26.49±0.72	34.52±0.48
4	52.60±1.43	77.44±1.63	21.69±0.63	0.24±0.00	86.84±1.51	13.18±0.58	44.80±1.03	29.33±0.27
5	66.64±2.32	42.31±0.56	10.11±0.62	29.36±0.96	12.27±0.29	13.54±0.59	50.19±0.50	35.64±0.86
s1 : season 1 ; s2 : season 2								

- 數值超過檢測最高標準

八、噴氣孔的土壤無機氮含量

第一季噴氣孔土壤氮態氮含量介於 0.26~1.57 ppm; 第二季則介於 0.69~2.09 ppm，整體有提高的趨勢(表 9)。土壤的硝酸態氮也有相同的趨勢(表 10)。第二季兩季土壤的無機氮包括氨離子及硝酸根離子含量平均都比溫泉水高。

表 9 兩季噴氣孔採樣點的土壤氮態氮含量(ppm)

噴氣孔	大磺嘴		大油坑		小油坑		四磺坪	
	s1	s2	s1	s2	s1	s2	s1	s2
1	0.67±0.12	2.04±0.24	1.57±0.09	0.86±0.10	1.55±0.26	0.84±0.12	0.50±0.10	2.09±0.10
2	0.88±0.23	1.73±0.18	0.26±0.07	0.88±0.22	0.71±0.19	0.75±0.19	1.42±0.16	1.12±0.06
3	0.68±0.06	1.59±0.11	0.63±0.11	1.10±0.12	0.75±0.18	1.05±0.17	0.66±0.07	1.01±0.13
4	0.52±0.10	1.35±0.14	1.22±0.06	0.75±0.11	0.90±0.06	0.69±0.10	1.42±0.06	1.18±0.14
5	0.70±0.14	1.09±0.13	0.68±0.18	0.73±0.05	0.80±0.12	0.75±0.19	0.74±0.06	1.91±0.20
s1 : season 1 ; s2 : season 2								

表 10 兩季噴氣孔採樣點的土壤硝酸態氮含量(ppm)

噴氣孔	大礮嘴		大油坑		小油坑		四礮坪	
	s1	s2	s1	s2	s1	s2	s1	s2
1	0.43±0.03	6.50±0.00	3.73±0.03	1.07±0.03	0.83±0.03	4.03±0.03	31.73±0.09	14.67±0.19
2	6.10±0.00	7.63±0.03	1.53±0.07	0.97±0.03	3.13±0.09	3.17±0.07	16.63±0.03	13.50±0.21
3	20.07±0.03	7.20±0.00	2.40±0.06	2.70±0.00	2.50±0.00	3.63±0.03	1.57±0.07	45.17±0.03
4	1.07±0.07	3.10±0.00	2.17±0.03	0.63±0.03	15.33±0.3	13.43±0.03	87.63±0.49	36.53±0.09
5	1.40±0.00	1.13±0.03	0.87±0.07	2.80±0.06	15.80±0.00	23.47±0.03	69.17±0.33	44.70±0.06
s1 : season 1 ; s2 : season 2								

九、四個地點噴氣孔的土壤性質比較

四處採樣點的第一季土壤化學性質除了硝酸態氮外，其他包括 pH 值、凱氏全氮及有機質等經統計分析後顯示樣本之間並無顯著差異(表 11)。第二季則除了有機質、氨態氮及硝酸態氮採樣地區有差異外，其他 pH 值、凱氏全氮及硫含量均無明顯差異(表 12)。

表 11 第一季噴氣孔採樣點的土壤性質比較

樣區	含水率	pH值	凱氏全氮	有機質	硫	無機氮(ppm)	
			(%)	(%)	(%)	氨態氮	硝酸態氮
大礮嘴	21.23±2.23 ^a	1.48±0.10 ^a	0.11±0.01 ^a	5.69±0.40 ^a	48.53±3.37 ^a	0.69±0.14 ^a	5.81±3.35 ^a
大油坑	21.29±3.96 ^a	1.25±0.16 ^a	0.17±0.03 ^a	5.44±0.72 ^a	18.37±1.49 ^a	0.87±1.01 ^a	2.14±0.87 ^a
小油坑	25.14±3.43 ^a	1.49±0.24 ^a	0.13±0.02 ^a	5.97±1.64 ^a	29.85±17.45 ^a	0.94±0.41 ^a	7.52±4.18 ^a
四礮坪	20.95±2.49 ^a	1.20±0.11 ^a	0.15±0.03 ^a	8.31±0.96 ^a	44.74±2.25 ^a	0.95±0.37 ^a	41.35±8.84 ^b

表 12 第二季噴氣孔採樣點的土壤性質比較

樣區	含水率	pH值	凱氏全氮	有機質	硫	無機氮(ppm)	
			(%)	(%)	(%)	氨態氮	硝酸態氮
大礮嘴	25.61±3.85 ^a	1.07±0.09 ^a	0.10±0.02 ^a	3.61±0.54 ^a	39.96±4.44 ^a	1.56±0.27 ^a	5.11±1.03 ^a
大油坑	15.37±3.21 ^a	1.61±0.06 ^a	0.45±0.35 ^a	3.24±1.08 ^a	11.31±9.10 ^a	0.86±0.16 ^b	1.63±1.05 ^a
小油坑	24.06±3.60 ^a	1.48±0.45 ^a	0.10±0.03 ^a	2.70±0.26 ^a	15.90±1.75 ^a	0.82±0.16 ^b	9.55±4.99 ^a
四礮坪	16.21±2.49 ^a	1.62±0.26 ^a	0.29±0.06 ^a	6.38±0.75 ^b	43.44±4.86 ^a	1.46±0.47 ^a	30.91±4.29 ^b

兩季一些特定地區噴氣孔土壤的化學性質包括 pH、凱氏全氮、有機質及氨態氮有明顯差異($P < 0.05$)(表 13)。其中，pH 值有變高也有變低的現象；四礮坪採樣點第二季土壤全氮含量顯著地增加；有機質的部分，四個採樣點含量均減少；且只有大礮嘴的氨態氮第二季顯著提高許多。

表 13 兩季噴氣孔採樣點的土壤性質比較

樣區	含水率		pH值		凱氏全氮		有機質		硫		無機氮(ppm)			
					(%)		(%)		(%)		氨態氮		硝酸態氮	
	s1	s2	s1	s2	s1	s2	s1	s2	s1	s2	s1	s2	s1	s2
大礮嘴	21.23±2.23 ^a	25.61±3.85 ^a	1.48±0.10 ^a	1.07±0.09 ^b	0.11±0.01 ^a	0.10±0.02 ^a	5.69±0.40 ^a	3.61±0.54 ^b	48.53±3.37 ^a	39.96±4.44 ^a	0.69±0.14 ^a	1.56±0.27 ^b	5.81±3.35 ^a	5.11±1.03 ^a
大油坑	21.29±3.96 ^a	15.37±3.21 ^a	1.25±0.16 ^a	1.61±0.06 ^b	0.17±0.03 ^a	0.45±0.35 ^a	5.44±0.72 ^a	3.24±1.08 ^a	18.37±1.49 ^a	11.31±9.10 ^a	0.87±1.01 ^a	0.86±0.16 ^a	2.14±0.87 ^a	1.63±1.05 ^a
小油坑	25.14±3.43 ^a	24.06±3.60 ^a	1.49±0.24 ^a	1.48±0.45 ^a	0.13±0.02 ^a	0.10±0.03 ^a	5.97±1.64 ^a	2.70±0.26 ^b	29.85±17.45 ^a	15.90±1.75 ^a	0.94±0.41 ^a	0.82±0.16 ^a	7.52±4.18 ^a	9.55±4.99 ^a
四礮坪	20.95±2.49 ^a	16.21±2.49 ^a	1.20±0.11 ^a	1.62±0.26 ^b	0.15±0.03 ^a	0.29±0.06 ^b	8.31±0.96 ^a	6.38±0.75 ^a	44.74±2.25 ^a	43.44±4.86 ^a	0.95±0.37 ^a	1.46±0.47 ^a	41.35±8.84 ^a	30.91±4.29 ^a

s1 : season 1 ; s2 : season 2

字母相同代表無顯著差異($P > 0.05$)

十、噴氣孔的土壤質地

陽明山噴氣孔由於大量硫磺的產生導致石礮酸化鬆軟，現場採樣已明顯可見土壤質地屬砂質，樣本帶回實驗室經過土壤機械分析後結果顯示砂粒比例確實最高(表 14)。三種土壤顆粒比例經過土壤三角圖對照後得到所有樣本的土壤質地(表 15)包括砂土、砂質壤土或壤質砂土。第二季的部分土樣經分析後結果顯示與第一季的土樣質地並無差別，因為採樣時間前後差別只約五個月，不足以導致土壤質地的變化。

表 14 噴氣孔的土壤粒徑比例

噴氣孔	四礮坪			大油坑			小油坑			大礮嘴		
	砂粒%	粘粒%	粉粒%	砂粒%	粘粒%	粉粒%	砂粒%	粘粒%	粉粒%	砂粒%	粘粒%	粉粒%
1	71	9	20	89	4	7	75	5	20	82	8	10
2	72	4	24	65	10	25	64	19	17	83	5	12
3	86	7	7	80	3	17	58	9	33	63	8	29
4	68	6	26	80	3	17	82	7	11	84	5	11
5	72	7	21	68	10	22	61	5	34	80	4	16

表 15 噴氣孔的土壤質地

噴氣孔	四礮坪	大油坑	小油坑	大礮嘴
1	砂質壤土	砂土	壤質砂土	壤質砂土
2	壤質砂土	砂質壤土	砂質壤土	壤質砂土
3	壤質砂土	壤質砂土	砂質壤土	砂質壤土
4	砂質壤土	壤質砂土	壤質砂土	壤質砂土
5	壤質砂土	砂質壤土	砂質壤土	壤質砂土

十一、溫泉水的化學性質分析

採取一部分溫泉水裝棕色玻璃瓶封頂冷藏帶回實驗室經過 $0.45\mu\text{m}$ 濾膜過濾後立即量測化學性質，所得結果如表 16。所取的溫泉水樣本中所量測的溫度(圖 5)以大礮嘴處為最高，其次為四礮坪、大油坑及小油坑。pH 與土壤一樣呈現極酸性，介於 1.26-2.67，以大油坑處溫泉水酸性最低，因為其水樣 SO_4^{2-} 含量最高，小油坑水樣 SO_4^{2-} 含量比起其他 3 個水樣則較低。大油坑及小油坑溫泉水



圖 5 現場溫泉水溫度量測狀況

SO_4^{2-} 含量比起李重義於 2009 年同一季節所量測的含量還要高(分別為 3096–3388 mg L^{-1} 與 481 mg L^{-1})(李重義, 2009)。全氮量(N)與硝酸根離子濃度(NO_3^-)以硫磺谷為最高。第二季溫泉水 pH 值無太大變異, N 與 NO_3^- 含量普遍比第一季來的低, 只有小油坑第二季含量反而增加。四處溫泉水 SO_4^{2-} 含量整體增加, 而且大油坑含量仍然是最高。第二季採樣時溫泉水明顯量增加許多, 推測該季節下雨頻繁。

表 16 兩季溫泉水的化學性質分析(mg L^{-1})

	大磺嘴		大油坑		小油坑		四磺坪	
	s1	s2	s1	s2	s1	s2	s1	s2
Temp.	97.5	90.1	87.8	78.0	75.1	70.0	92.8	98.0
N	5.1	1.9	1.1	0.4	1.9	0.6	2.6	0.6
NO_3^-	2.8	1.8	1.6	1.6	0.5	3.4	1.5	0.7
NO_2^-	0.53	0.11	0.57	0.57	0.23	0.80	0.33	0.56
NH_4^+	0.14	0.00	0.06	0.54	0.03	0.09	0.21	0.22
pH	2.14±0.01	1.86±0.01	1.26±0.06	1.42±0.02	2.67±0.02	1.38±0.01	1.96±0.01	1.62±0.01
SO_4^{2-}	2807±106	3233±107	4725±37	4044±402	1200±50	2052±17	1840±34	3126±7

數值含有標準誤差表示實驗分析 3 重複; s1 : season 1 ; s2 : season 2

第二節 兩季噴氣孔土壤與溫泉水細菌群落組成與歧異度

一、溫泉水樣細菌核酸萃取及 PCR

溫泉水採集後運送回屏科大實驗室立刻進行過濾 10 μ m 濾膜後的濾液接著進行超高速離心集菌(12000 g, 40 分鐘)。菌落保存於-20°C，直至進行核酸萃取。溫泉菌已完成核酸萃取及後續 V6V8 的片段擴增放大(圖 6, 圖 7)，兩季樣本處理方式均相同。

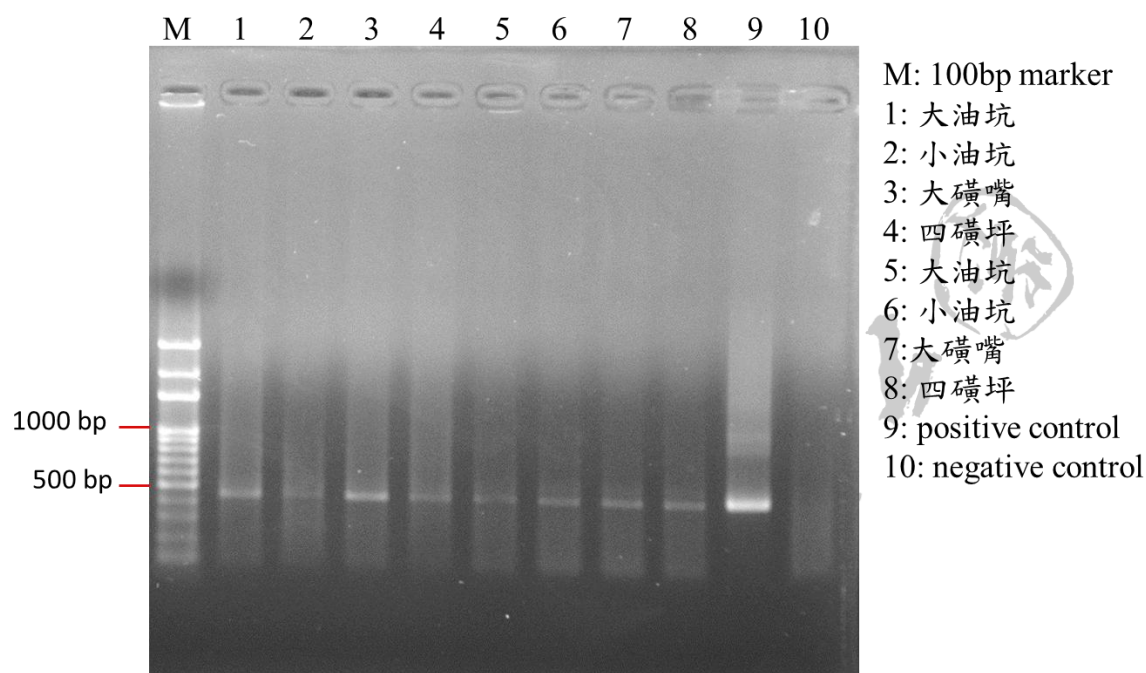


圖 6 部分樣本溫泉菌 V6V8 擴增放大後的結果

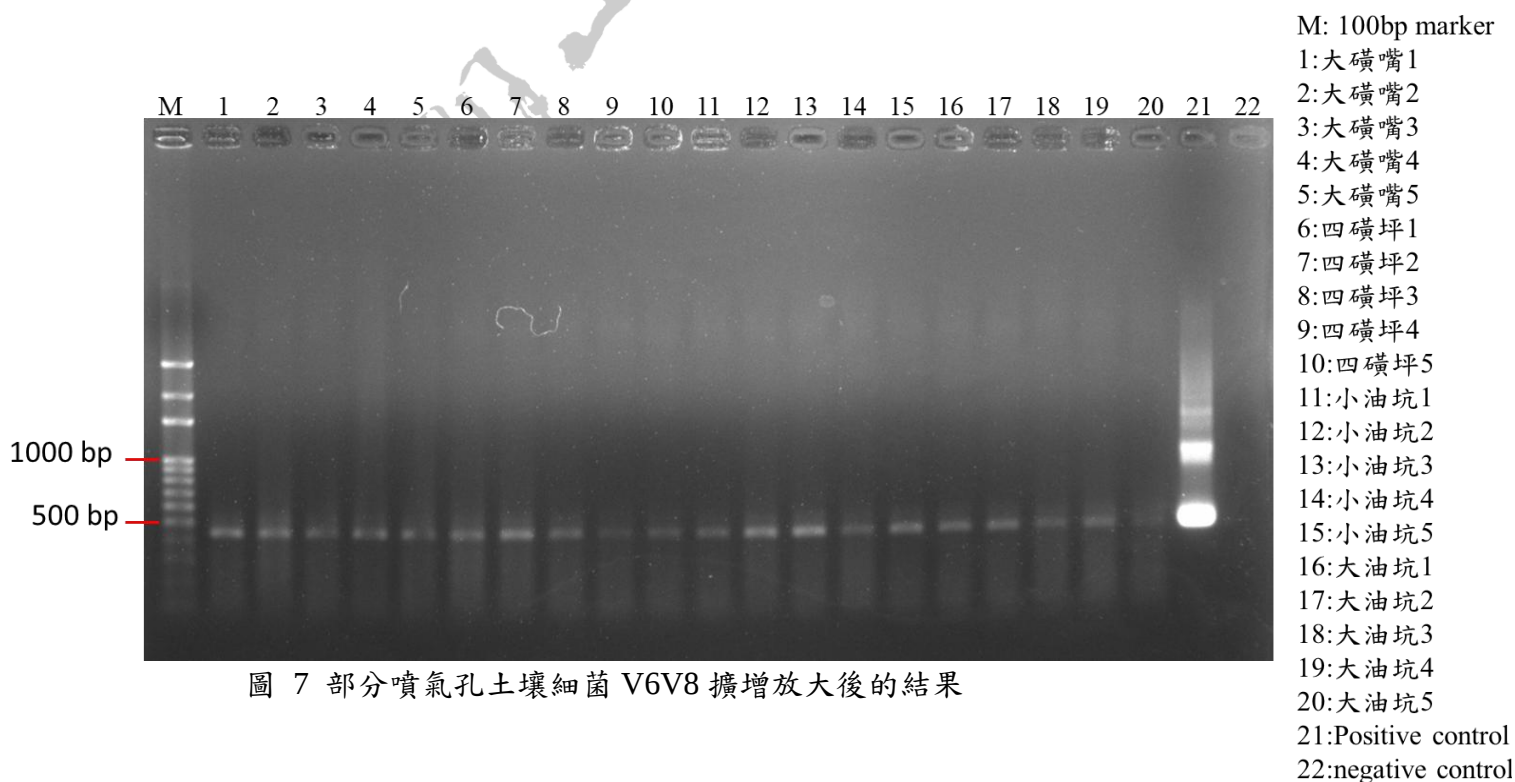


圖 7 部分噴氣孔土壤細菌 V6V8 擴增放大後的結果

二、第一季與第二季噴氣口火山土壤及溫泉水微生物群落結構

第一季樣本總共獲得 290,621 條高品質的序列，經過 97% 的序列相似度排列分類最後共得到 3968 個 OTU，序列資料庫比對後共得到 41 個門、121 個綱、238 個目、411 個科及 702 個屬。以門分類層級來看，*Proteobacteria* 為最優勢、*Firmicutes* 次之再來是 *Actinobacteria* (圖 8)。以綱分類層級來看，*Gammaproteobacteria* 為最優勢、*Betaproteobacteria* 次之再來是 *Alphaproteobacteria* (圖 9)。以屬的分類層級來看，*Pseudomonas* 為最優勢、*Delftia* 次之再來是 *Sulfobacillus* (圖 10)。以種的分類層級來看，*Pseudomonas* sp. 為最優勢、*Delftia* sp. 次之再來是 *Sulfobacillus* sp. (圖 11)。

第二季樣本總共獲得 5,200,686 條高品質的序列，經過 97% 的序列相似度排列分類最後共得到 9887 個 OTU，序列資料庫比對後共得到 35 個門、106 個綱、221 個目、415 個科及 994 個屬。以門分類層級來看，*Proteobacteria* 為最優勢、*Firmicutes* 次之再來是 *Actinobacteria* (圖 12)。以綱分類層級來看，*Gammaproteobacteria* 為最優勢、*Betaproteobacteria* 次之再來是 *Bacilli* (圖 13)。以屬的分類層級來看，*Pseudomonas* 為最優勢、*Delftia* 次之再來是 *Methylobacteriaceae*:NA (圖 14)。兩季不同分類層級相比，綱的層級以下出現有差異，但最優勢的菌群仍然是相同。

三、第一季與第二季四處噴氣口火山土壤及溫泉水細菌菌種豐度與歧異度

四處噴氣孔土壤所偵測到的 OTU 及歧異度平均第二季比第一季來的多。大油坑 OTU 數第一季介於 86-1784 第二季介於 1443-2059(表 17); 大磺嘴 OTU 數第一季介於 172-466 第二季介於 920-1883(表 18); 四磺坪 OTU 數第一季介於 332-626 第二季介於 1136-1601(表 19); 小油坑 OTU 數第一季介於 86-168 第二季介於 1350-2086(表 20)。溫泉水第一季測到最高 OTU 數是在大油坑，第二季則是在四磺坪(表 21)。溫泉水兩季的最高歧異度均出現在四磺坪，代表兩季之間的菌群確實有動態變化。

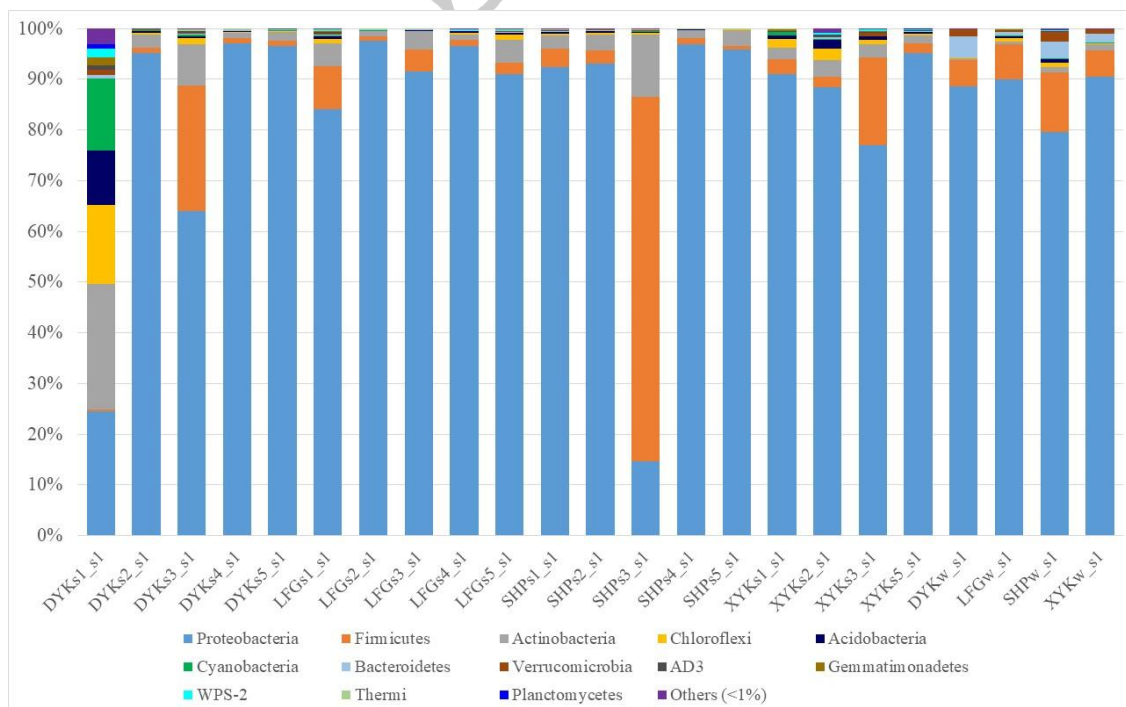


圖 8 分類層級為門之噴氣孔土壤及溫泉水細菌群落結構組成

DYKs: 大油坑噴氣孔土壤; LFGs: 大磺嘴噴氣孔土壤; SHPs: 四磺坪噴氣孔土壤;

XYKs: 小油坑噴氣孔土壤; DYKw, LFGw, SHPw, XYKw: 分別為四個地點的溫泉水

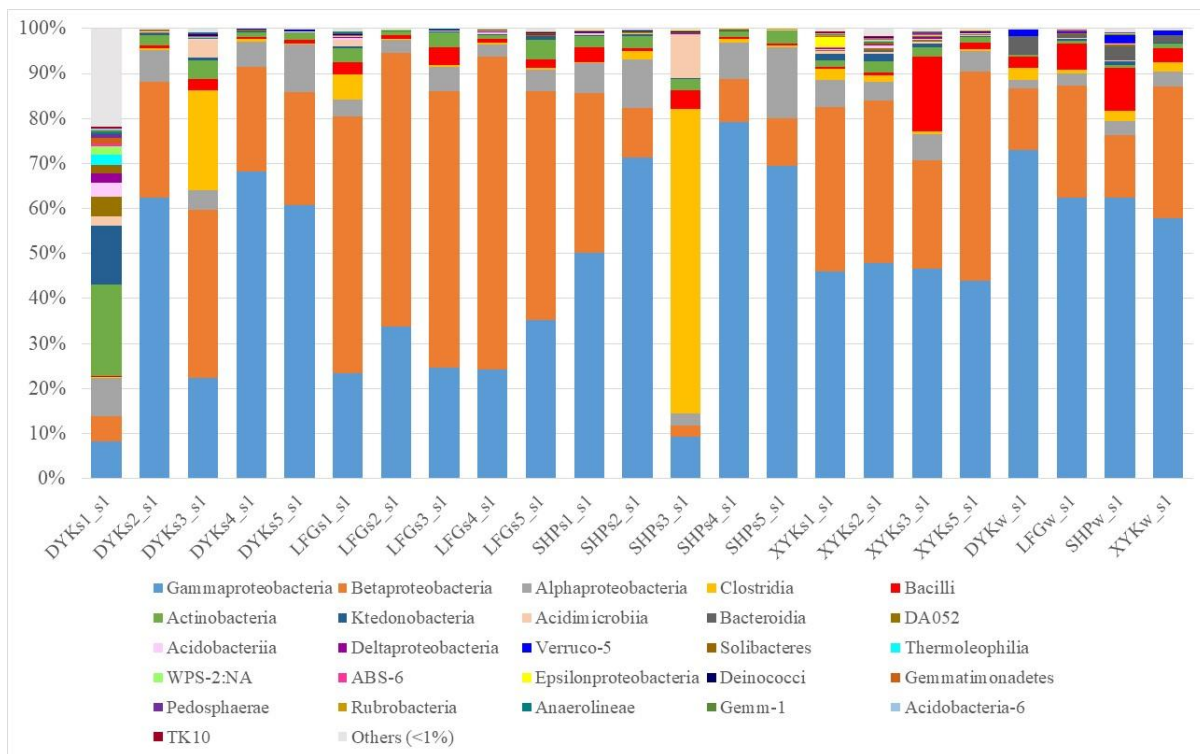


圖 9 分類層級為綱之噴氣孔土壤及溫泉水細菌群落結構組成

DYKs: 大油坑噴氣孔土壤; LFGs: 大磺嘴噴氣孔土壤; SHPs: 四磺坪噴氣孔土壤;
XYKs: 小油坑噴氣孔土壤; DYKw, LFGw, SHPw, XYKw: 分別為四個地點的溫泉水

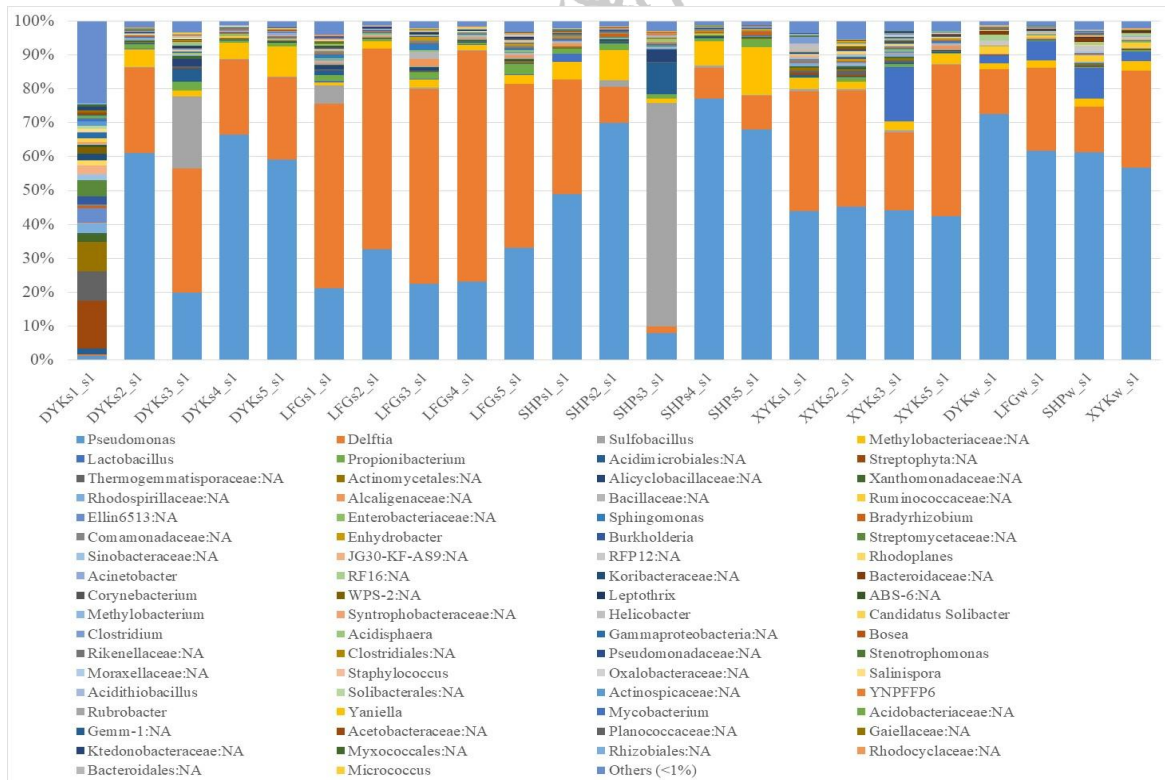


圖 10 分類層級為屬之噴氣孔土壤及溫泉水細菌群落結構組成

DYKs: 大油坑噴氣孔土壤; LFGs: 大磺嘴噴氣孔土壤; SHPs: 四磺坪噴氣孔土壤;
XYKs: 小油坑噴氣孔土壤; DYKw, LFGw, SHPw, XYKw: 分別為四個地點的溫泉水

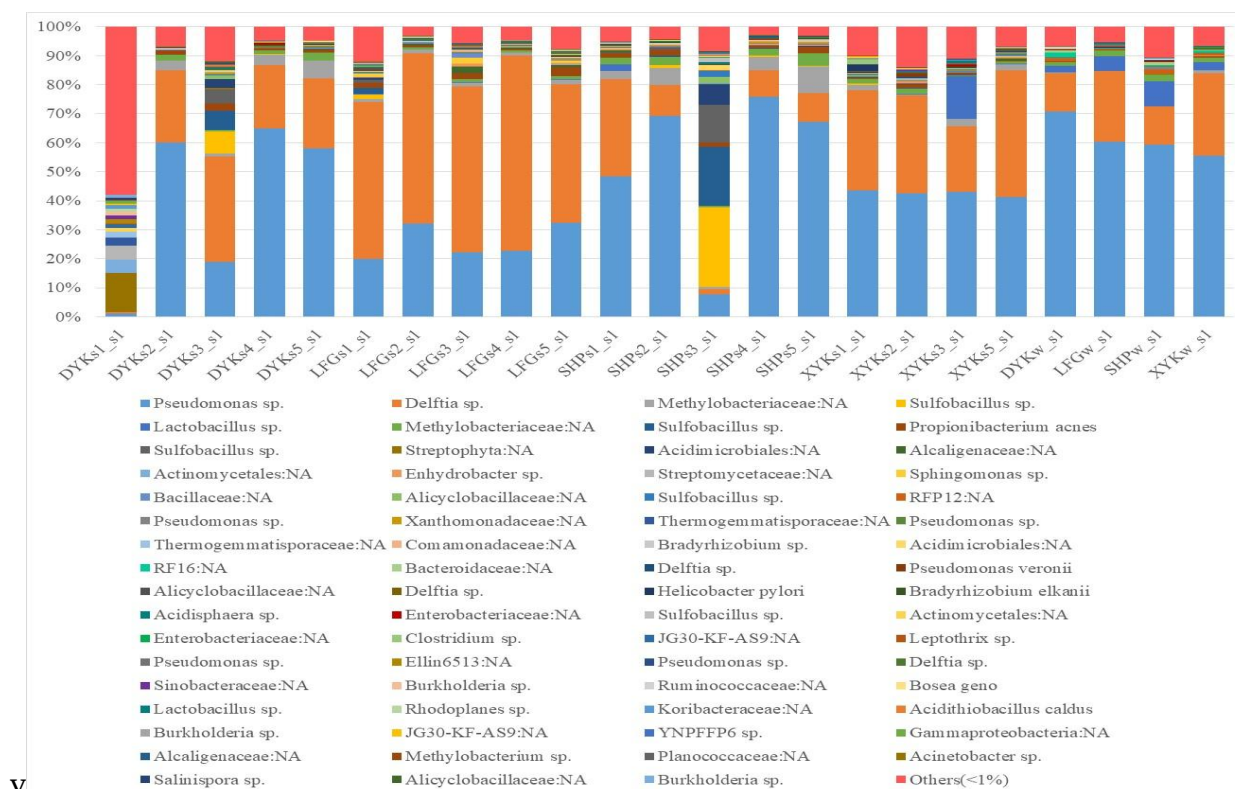


圖 11 分類層級為種之噴氣孔土壤及溫泉水細菌群落結構組成
 DYKs: 大油坑噴氣孔土壤; LFGs: 大磺嘴噴氣孔土壤; SHPs: 四磺坪噴氣孔土壤;
 XYKs: 小油坑噴氣孔土壤; DYKw, LFGw, SHPw, XYKw:分別為四個地點的溫泉水

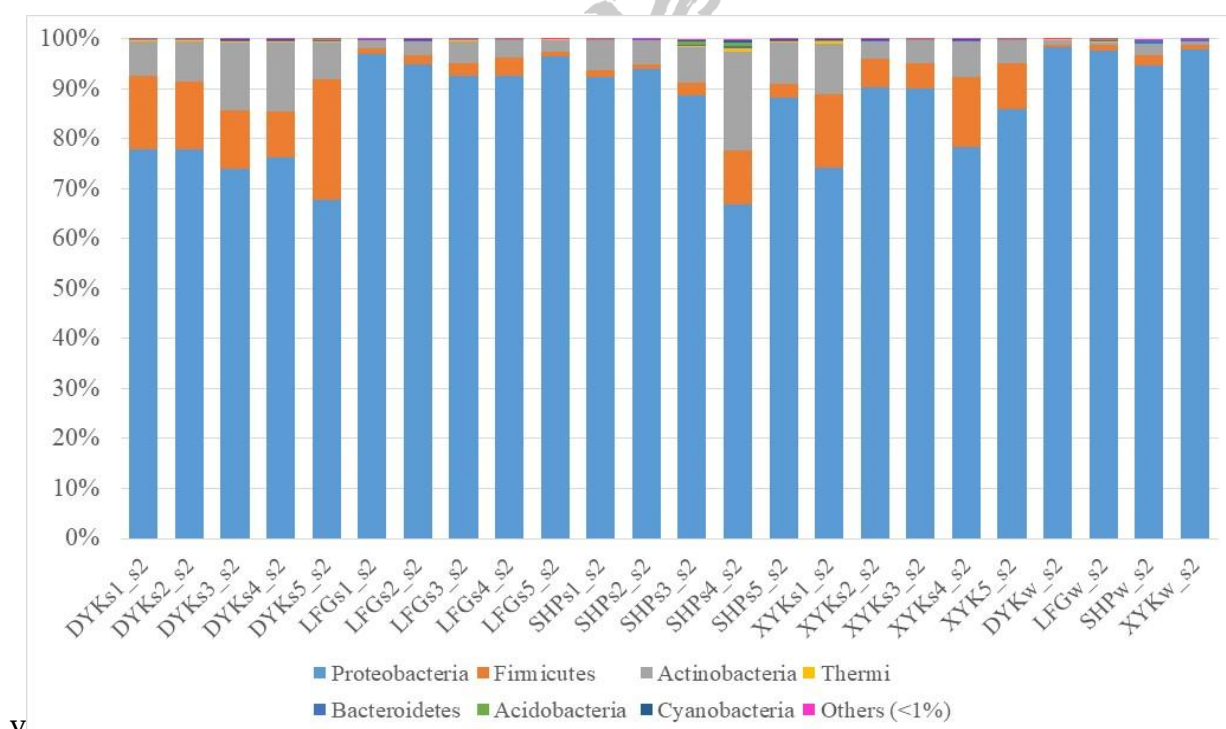


圖 12 分類層級為門之噴氣孔土壤及溫泉水細菌群落結構組成
 DYKs: 大油坑噴氣孔土壤; LFGs: 大磺嘴噴氣孔土壤; SHPs: 四磺坪噴氣孔土壤;
 XYKs: 小油坑噴氣孔土壤; DYKw, LFGw, SHPw, XYKw:分別為四個地點的溫泉水

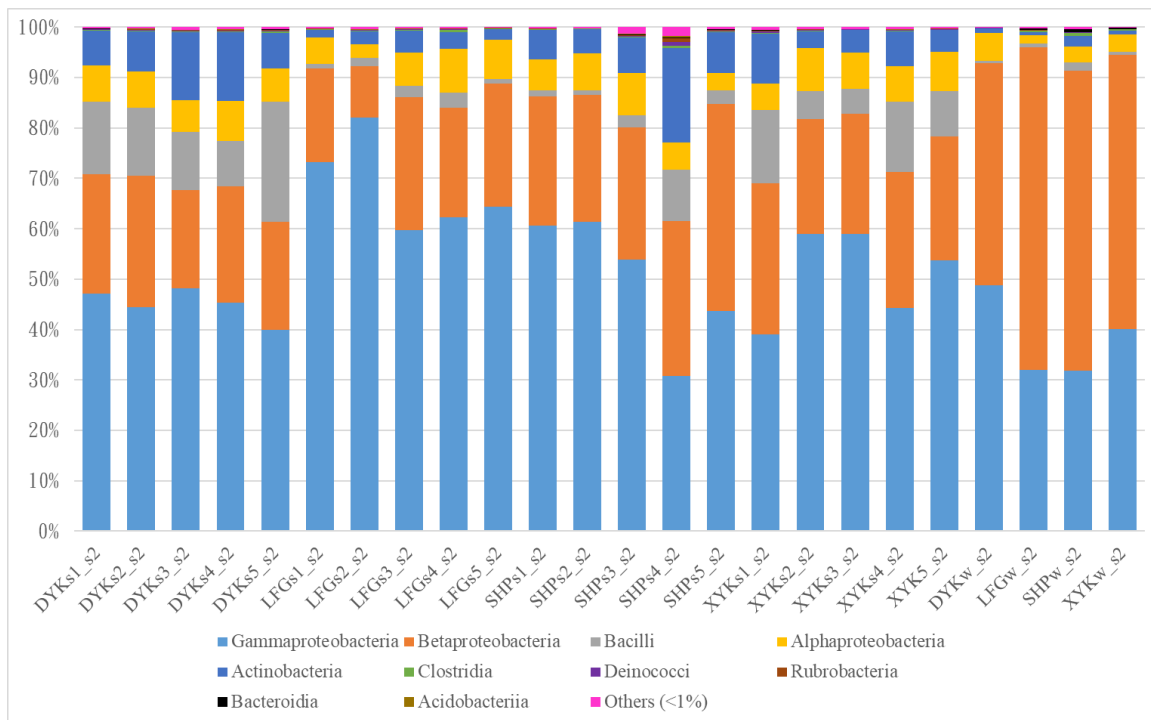


圖 13 分類層級為綱之噴氣孔土壤及溫泉水細菌群落結構組成

DYKs: 大油坑噴氣孔土壤; LFGs: 大磺嘴噴氣孔土壤; SHPs: 四磺坪噴氣孔土壤;
XYKs: 小油坑噴氣孔土壤; DYKw, LFGw, SHPw, XYKw:分別為四個地點的溫泉水

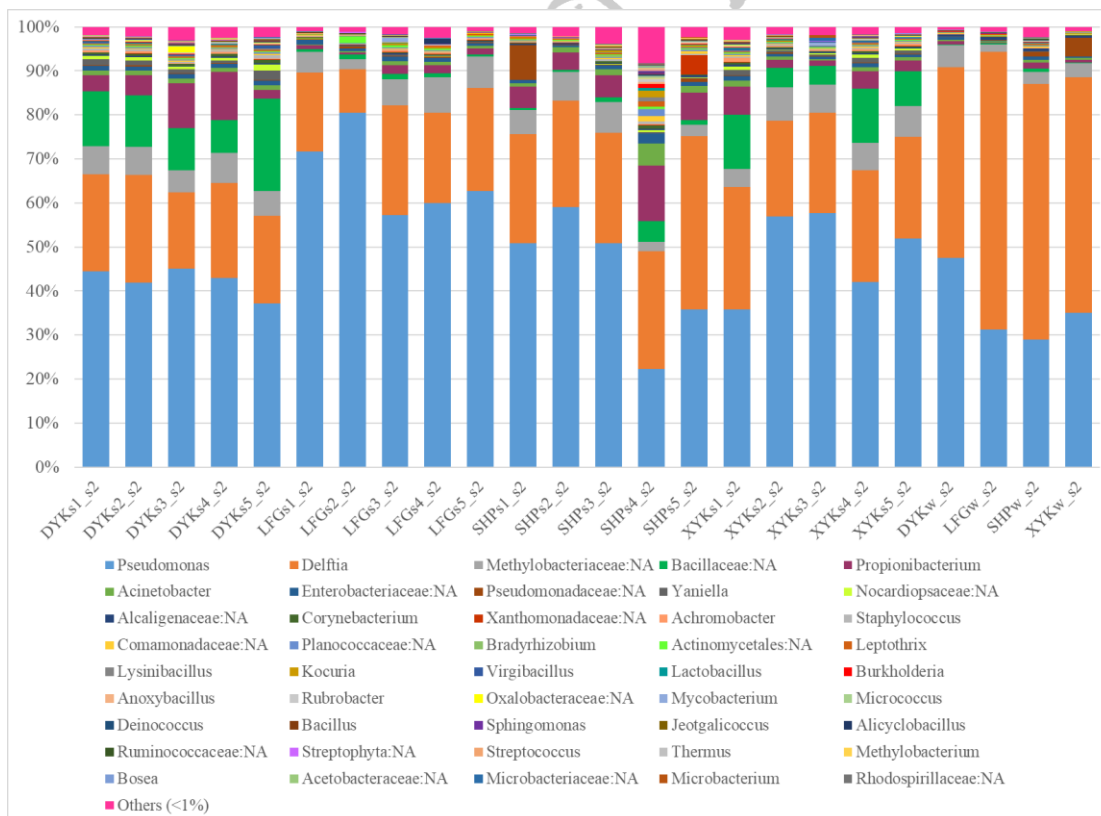


圖 14 分類層級為屬之噴氣孔土壤及溫泉水細菌群落結構組成

DYKs: 大油坑噴氣孔土壤; LFGs: 大磺嘴噴氣孔土壤; SHPs: 四磺坪噴氣孔土壤;
XYKs: 小油坑噴氣孔土壤; DYKw, LFGw, SHPw, XYKw:分別為四個地點的溫泉水

表 17 第一季與第二季大油坑噴氣孔土壤及溫泉水細菌菌種豐度與歧異度

	DYKs1_s1	DYKs2_s1	DYKs3_s1	DYKs4_s1	DYKs5_s1	DYKs1_s2	DYKs2_s2	DYKs3_s2	DYKs4_s2	DYKs5_s2
OTU	1784	95	86	102	112	1522	1443	2059	1637	1617
Chao1	4304±223	490±159	204±45	321±81	355±86	2693±127	2657±143	3496±138	2887±134	3091±158
ACE	4736±47	528±5	259±9	344±11	404±12	2690±30	2357±27	3393±32	2705±29	2999±32
Shannon-Wiener	5.53	1.49	2.56	1.35	1.52	2.59	2.61	2.70	2.58	2.71
Simpson	0.97	0.58	0.82	0.53	0.60	0.81	0.82	0.79	0.79	0.82
Simpson_inv	37.75	2.36	5.48	2.12	2.51	5.21	5.47	4.77	4.81	5.64

表 18 第一季與第二季大磺嘴噴氣孔土壤細菌菌種豐度與歧異度

	LFGs1_s1	LFGs2_s1	LFGs3_s1	LFGs4_s1	LFGs5_s1	LFGs1_s2	LFGs2_s2	LFGs3_s2	LFGs4_s2	LFGs5_s2
OTU	175	175	466	172	254	1045	920	1675	1833	1166
Chao1	503±90	725±170	1103±112	598±121	828±137	2251±141	2137±152	3169±149	3430±153	1915±92
ACE	606±16	807±18	1156±21	843±19	891±17	2635±35	2465±34	3124±34	3353±34	1919±25
Shannon-Wiener	2.17	1.28	1.81	1.27	1.92	1.74	1.58	2.15	2.19	1.62
Simpson	0.67	0.55	0.62	0.50	0.67	0.64	0.54	0.72	0.73	0.60
Simpson_inv	2.99	2.23	2.65	1.98	2.99	2.74	2.18	3.60	3.71	2.52

表 19 第一季與第二季大磺嘴噴氣孔土壤細菌菌種豐度與歧異度

	SHPs1_s1	SHPs2_s1	SHPs3_s1	SHPs4_s1	SHPs5_s1	SHPs1_s2	SHPs2_s2	SHPs3_s2	SHPs4_s2	SHPs5_s2
OTU	332	567	573	584	626	1136	1452	1449	1601	1525
Chao1	1114±164	1405±132	1432±138	1323±122	1181±91	1868±97	2760±145	2514±127	2794±133	2907±153
ACE	1223±21	1409±25	1519±25	1222±22	1120±20	1713±22	2538±29	2264±26	2844±32	2778±31
Shannon-Wiener	1.73	1.53	2.67	1.23	1.44	2.04	2.00	2.21	3.45	2.27
Simpson	0.65	0.50	0.85	0.41	0.53	0.72	0.72	0.71	0.88	0.74
Simpson_inv	2.86	2.01	6.78	1.70	2.12	3.52	3.51	3.43	8.24	3.85

表 20 第一季與第二季小油坑噴氣孔土壤細菌菌種豐度與歧異度

	XYKs1_s1	XYKs2_s1	XYKs3_s1	XYK5_s1	XYKs1_s2	XYKs2_s2	XYKs3_s2	XYKs4_s2	XYK5_s2
OTU	86	115	119	168	2086	1949	1502	1350	1753
Chao1	212±46	822±287	516±142	458±80	3659±144	3314±123	2763±137	2368±124	3062±128
ACE	335±14	1129±16	574±13	568±14	3720±36	3434±36	2622±29	2176±25	3200±34
Shannon-Wiener	1.93	2.12	2.15	1.68	2.65	2.08	2.20	2.57	2.34
Simpson	0.69	0.70	0.74	0.64	0.81	0.68	0.74	0.81	0.77
Simpson_inv	3.22	3.37	3.86	2.76	5.13	3.16	3.82	5.27	4.37

表 21 第一季與第二季溫泉水細菌菌種豐度與歧異度

	DYKw_s1	LFGw_s1	SHPw_s1	XYKw_s1	DYKw_s2	LFGw_s2	SHPw_s2	XYKw_s2
OTU	408	270	379	352	1253	892	1507	1128
Chao1	926±96	670±87	1131±143	866±99	2555±149	1778±112	3188±174	1926±95
ACE	1059±22	736±17	1231±21	1135±24	2466±30	1984±29	3016±33	2002±28
Shannon-Wiener	1.46	1.50	2.02	1.67	1.64	1.36	1.81	1.61
Simpson	0.48	0.57	0.62	0.61	0.67	0.55	0.62	0.63
Simpson_inv	1.93	2.34	2.65	2.56	3.06	2.25	2.63	2.72

四、多重變異分析兩季各樣區間細菌群落結構組成的相似性

第一季噴氣孔土壤與溫泉水細菌群落結構組成以 OTU 的分類層級來檢視，可以觀察到各樣區的噴

氣孔土壤與溫泉水細菌群落結構組成是有差異的。且大部分的每個樣區的五個土壤噴氣孔細菌群落結構組成都是相似的，在 NMDS 圖上分佈是聚在一起，除了四礮坪及大油坑各有一個噴氣孔土壤例外(圖 15)。第二季的噴氣孔土壤與溫泉水細菌群落結構組成以屬的分類層級來檢視(圖 16)，分佈的型態與第一季類似。大部分的每個樣區的五個土壤噴氣孔的點都是分佈聚在一起，除了四礮坪及大礮嘴各一個點例外

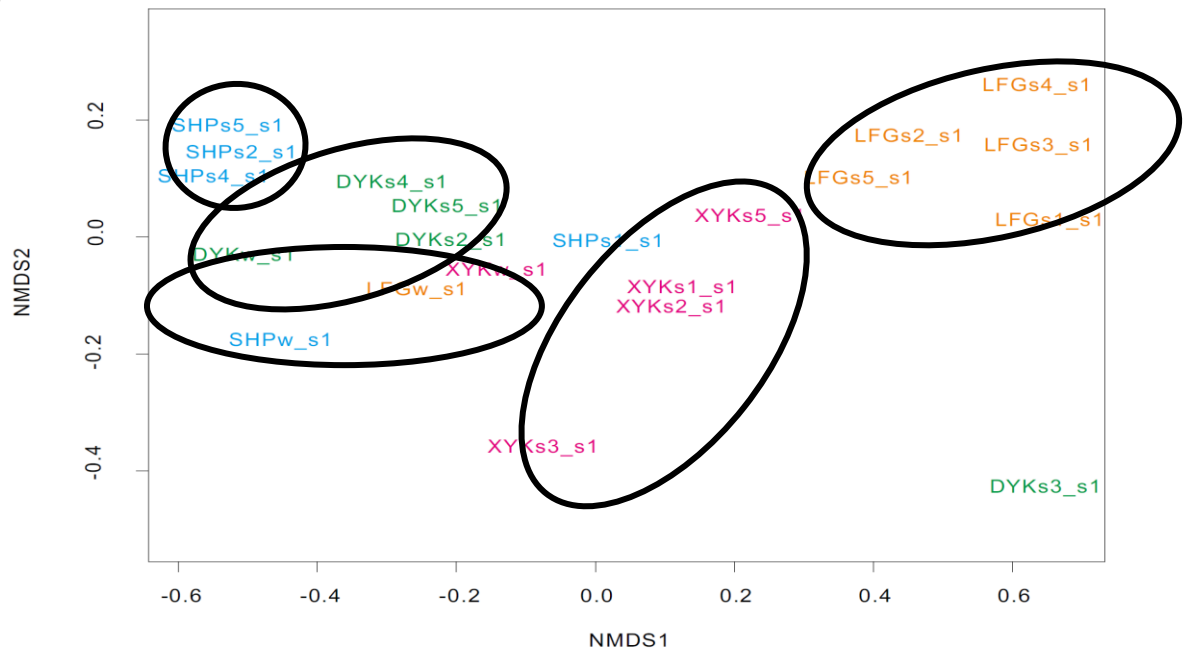


圖 15 NMDS 分析第一季各樣區間細菌群落結構組成的相似性(OTU 的分類層級，相對豐富度>1%)

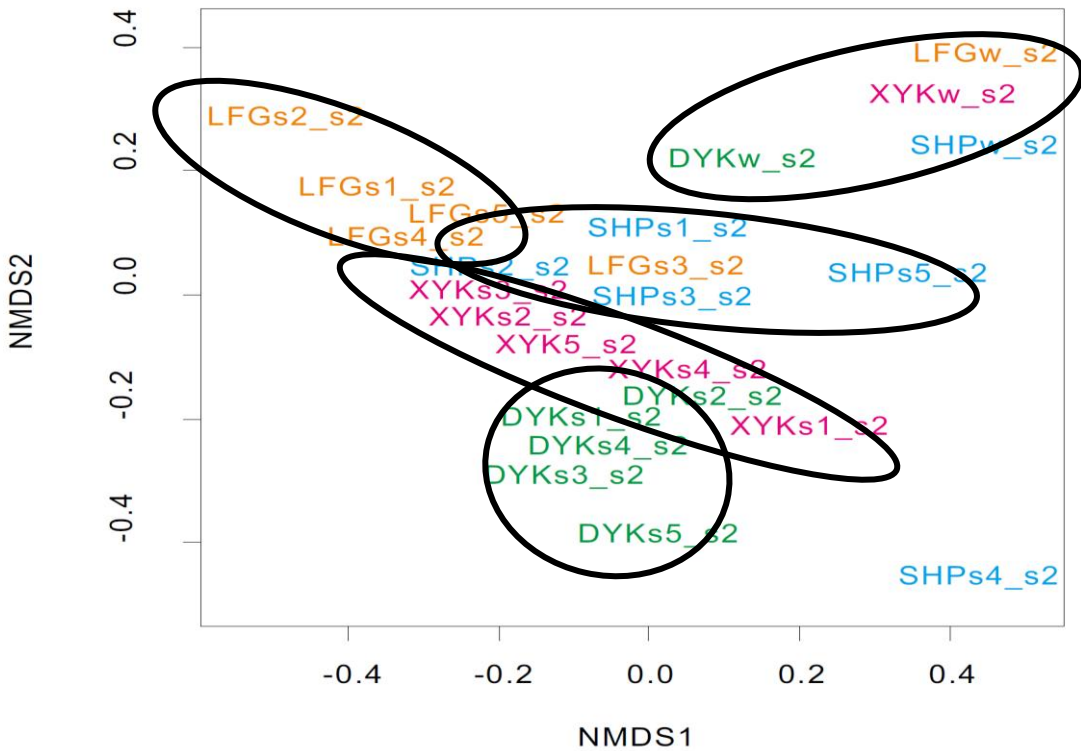


圖 16 NMDS 分析第一季各樣區間細菌群落結構組成的相似性(屬的分類層級，相對豐富度>1%)

五、監測噴氣口火山土壤及溫泉水菌群時間性的動態變化

兩季噴氣孔土壤與溫泉水細菌群落結構組成以種的分類層級來檢視，可以觀察到兩季的噴氣孔土壤與溫泉水細菌群落結構組成有明顯差異。兩季樣本在 NMDS 圖上分佈呈現兩群(圖 17)。進一步以熱點圖檢視最優勢的 50 種菌種在兩季的動態變化(圖 18)，所有樣本最優勢的菌種為 *Pseudomonas* sp. 及 *Delftia* sp.，次之是 *Sulfobacillus* sp.、*Methylobacteriaceae*:NA、*Propionibacterium acnes*，其中 *Delftia* sp. 很優勢的出現在兩季。兩種不同的 *Pseudomonas* sp. 則分別優勢的出現在乾濕季。*Sulfobacillus* sp. 則優勢出現在特定的樣區且兩季的相對豐富度有變異。菌群在兩季的噴氣孔土壤及溫泉水的消長各有特定的型態。

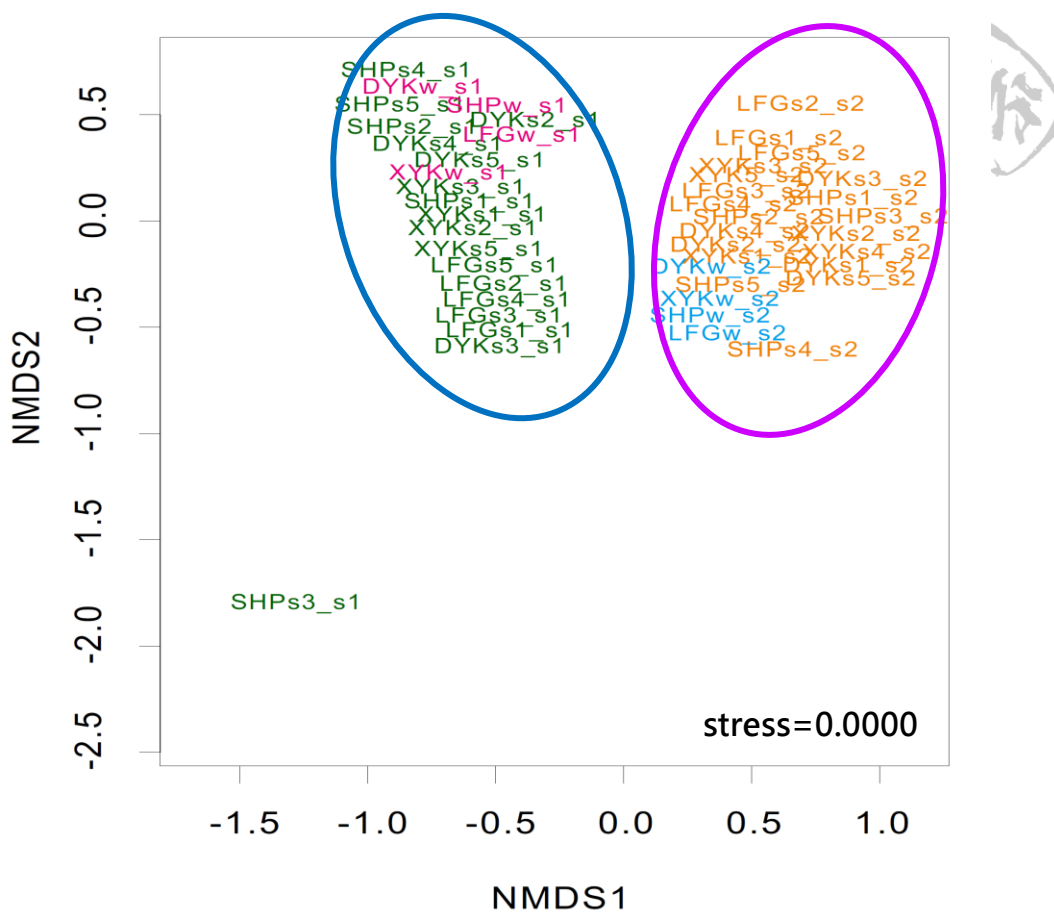


圖 17 NMDS 分析兩季各樣區間細菌群落結構組成的相似性(種的分類層級，相對豐富度>1%)

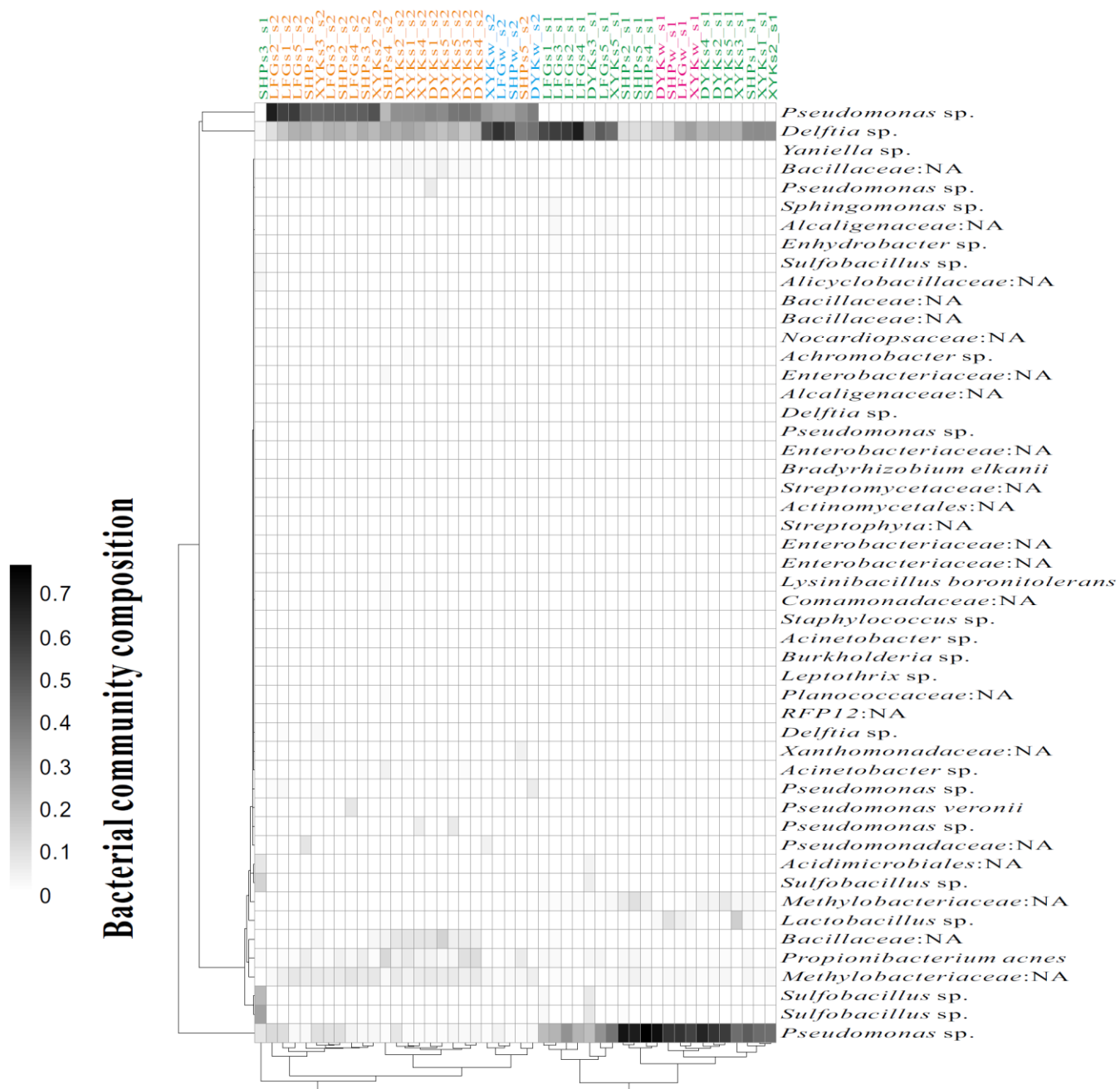


圖 18 熱點圖分析兩季各樣區間最優勢 50 種細菌群落的動態變化(種的分類層級，相對豐富度>1%)

第三節 兩季噴氣口與溫泉水細菌群落結構與環境變異

一、兩季噴氣口土壤與溫泉水細菌群落結構與環境變異

兩季噴氣口土壤的細菌群落結構明顯受到環境變因包括土壤有機物質(soil organic matter)、雨量(precipitation)及土壤酸鹼值(soil pH)的影響(圖 19)(表 22)($P < 0.05$)。 *Delftia* sp.與 *Pseudomonas* sp.受到雨量影響較顯著; *Leptothrix* sp.、*Deinococcus geothermalis* 及 *Micrococcus luteus* 則受到土壤酸鹼值影響; *Lactobacillus* sp.則受到土壤有機質影響。兩季溫泉水的細菌群落結構則明顯受到環境的 NH_4^+ 影響(圖 20) (表 23)($P < 0.05$)，其中多種 *Pseudomonas* sp.尤其受到的影響更顯著。

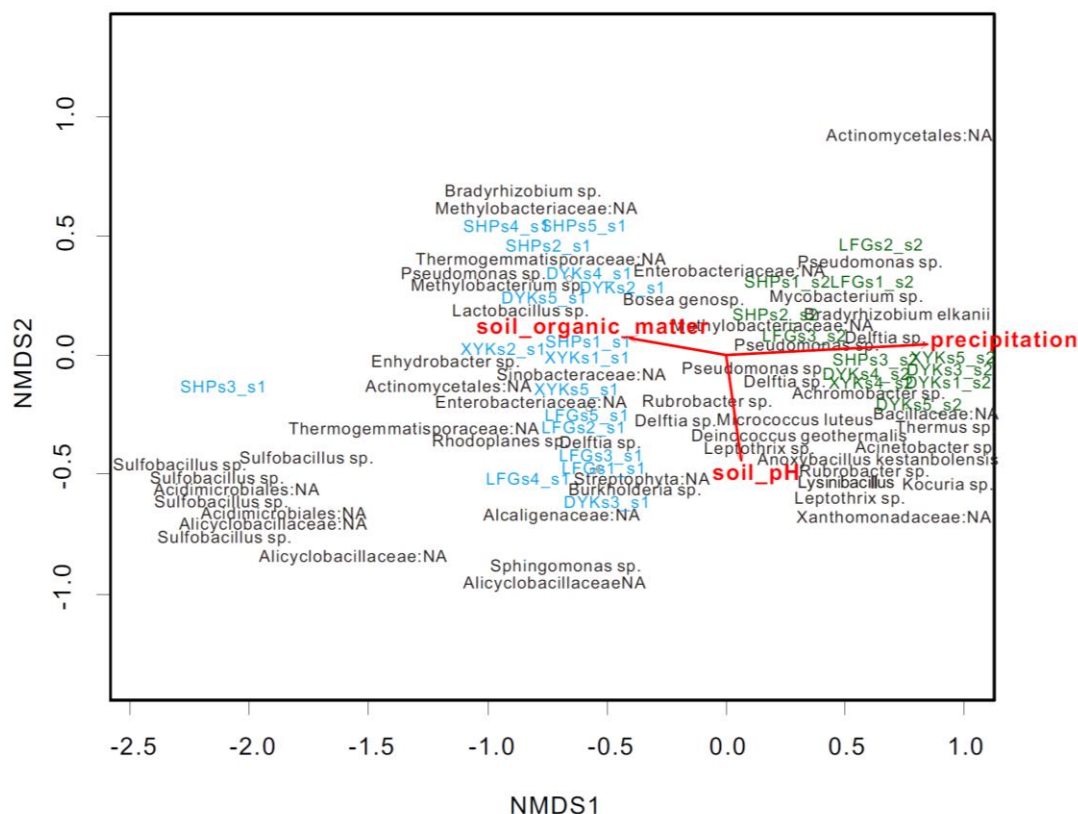


圖 19 多重變異分析兩季噴氣口土壤細菌群落結構與環境變異的關係

表 22 兩季噴氣口土壤與溫泉水細菌群落結構與環境變異的相關性

	NMDS1	NMDS2	r ²	Pr(>r)
precipitation	0.99852	0.05433	0.88	0.001***
elevation	0.94174	0.33633	0.007	0.868
Temp	-0.25249	-0.9676	0.0547	0.378
soil_moisture	-0.55141	0.83423	0.1066	0.15
soil_pH	0.15151	-0.98846	0.2404	0.01**
soil_N	0.70598	-0.70823	0.0406	0.504
soil_organic_matter	-0.98351	0.18085	0.2022	0.023*
S	-0.75433	-0.6565	0.008	0.859

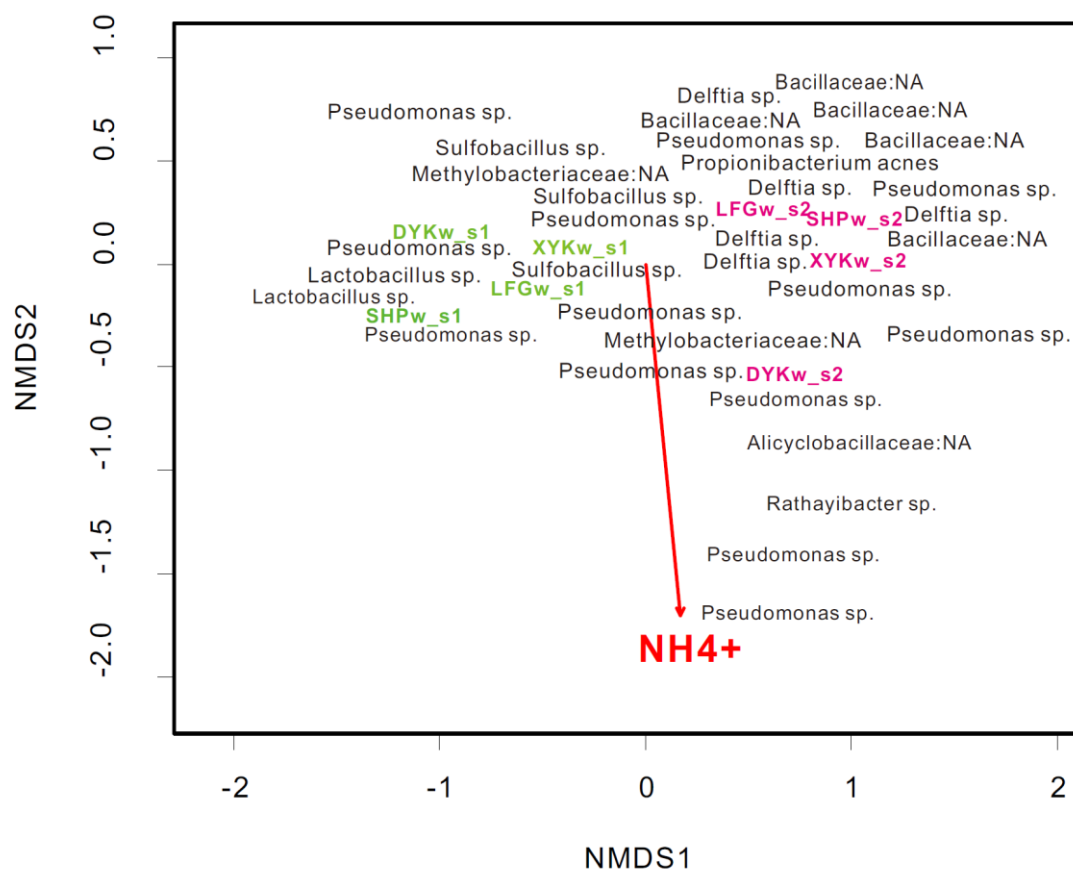


圖 20 多重變異分析兩季溫泉水細菌群落結構與環境變異的關係

表 23 兩季噴氣口溫泉水細菌群落結構與環境變異的相關性

	NMDS1	NMDS2	r ²	Pr(>r)
Temp	-0.27459	0.96156	0.162	0.638
N	-0.97049	-0.24115	0.3089	0.404
NO ₃ -	0.17572	-0.98444	0.0763	0.798
NO ₂ -	0.21798	-0.97595	0.1346	0.678
NH ₄ ⁺	0.09973	-0.99501	0.7397	0.036 *
pH	-0.66159	0.74986	0.1283	0.716
SO ₄ ²⁻	0.37897	-0.92541	0.0058	0.991

第四節 噴氣口土壤與溫泉水微生物分離培養

第一次採樣分離菌種的實驗只有四礮坪溫泉水有看到菌落(圖 21)，其他溫泉水及土壤樣本並無看到明顯菌落或是土粒直接塗盤無法辨認如圖 22。判斷第一次樣本菌種分離效果不佳原因可能 1. 樣本保存不當且沒有立刻塗盤 2. 溫泉水菌數少，取 50 ml 水離心塗盤可能菌數仍太少。

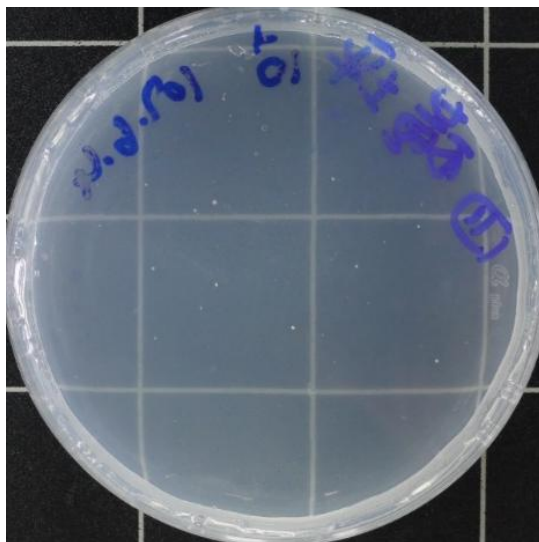


圖 21 四礮坪溫泉水塗盤狀態(第一季)
四礮坪溫泉水塗盤可見菌落生長

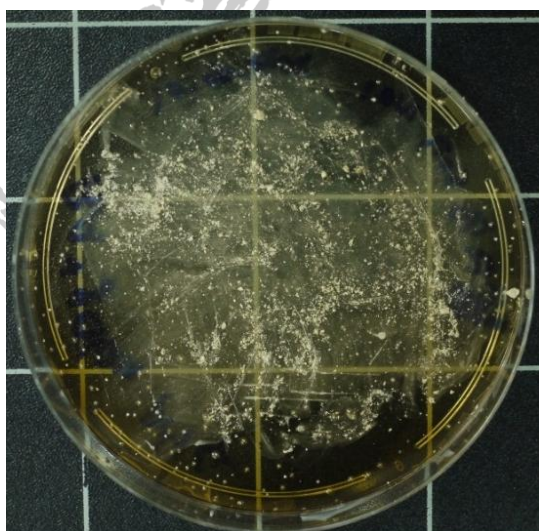


圖 22 噴氣孔土壤圖盤狀態(第一季)
噴氣孔土壤直接塗盤狀態，導致無法判別菌落還是土粒。

第二次採樣之菌種分離方法依第一次採樣缺點加以改善，此次採樣之土壤當天採回就立刻處理。直接取約 1 克土壤與 500 μ L 之 1 倍 PBS 均勻混合，取上清液分別塗抹於 R₂A agar 及 hot-spring base agar，並放入含暖暖包之保鮮盒中保溫，待送回屏科大森林系實驗室馬上放置 60 度培養箱培養(圖 23)。溫泉水送回屏科大森林系實驗室後，馬上低溫高速離心集菌(12,000g, 30min)除去上清液，以 200 μ L 之 1 倍 PBS 重新懸浮，再塗抹於 hot-spring base agar 上，放置 60 度培養箱培養培養 (圖 24)。

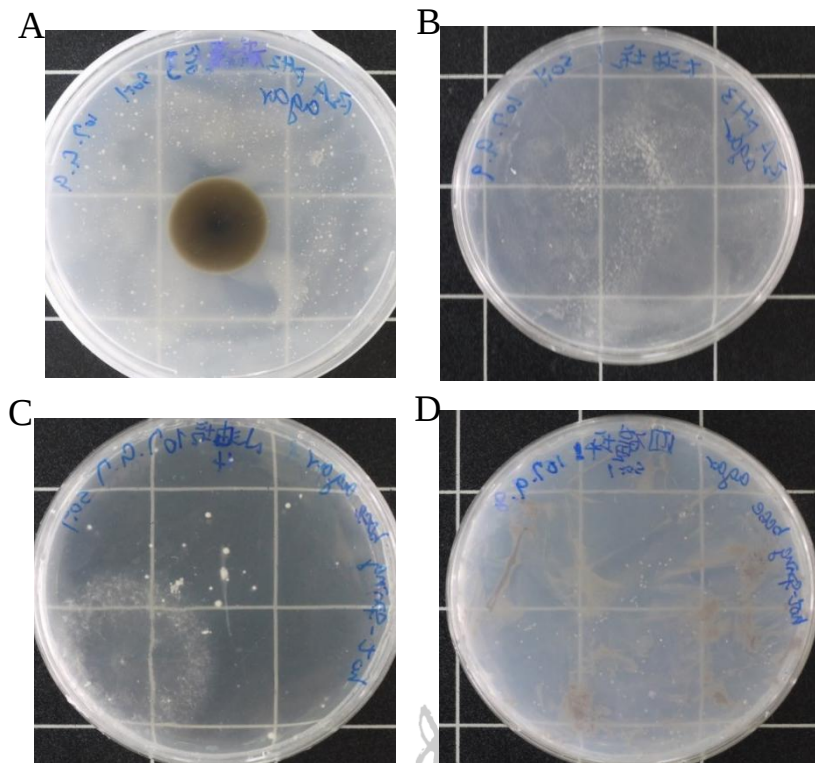


圖 23 噴氣孔土壤塗盤狀態(第二季)

A. 大礮嘴噴氣孔 B. 大油坑噴氣孔 C. 小油坑噴氣孔 D. 四礮坪噴氣孔

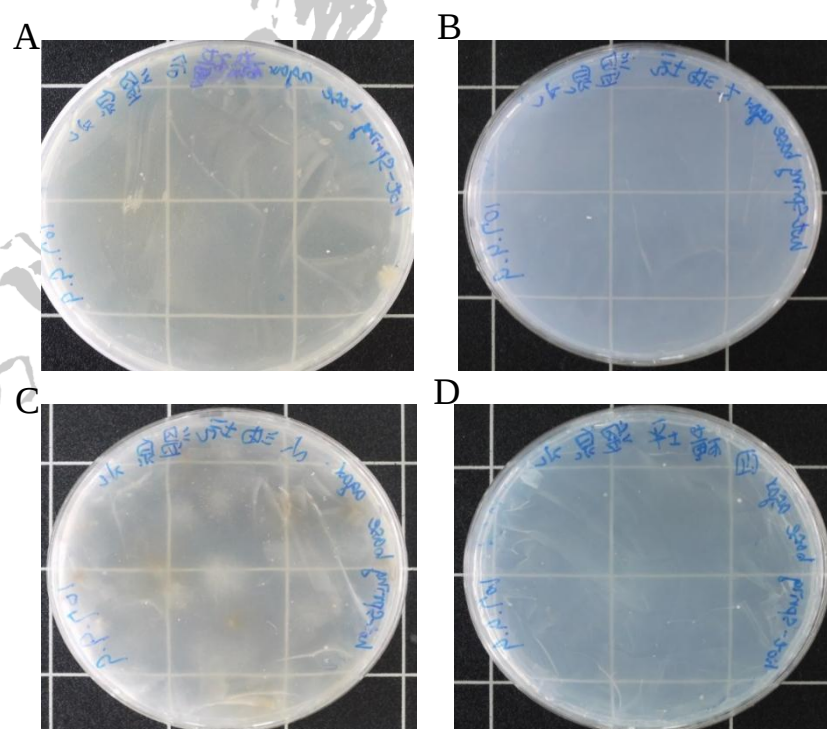


圖 24 溫泉水塗盤狀態(第二季)

A.大礮嘴 B.大油坑 C.小油坑 D.四礮坪

第四章 結論與建議

第一節 結論

本計畫主要針對園區內大磺嘴、小油坑、大油坑及四磺坪 4 個噴氣孔之火山土壤及溫泉水進行分析並比較不同季節採集的樣本，其環境參數是否會影響菌相和土壤性質的結果。今年兩次採樣的時間點(四月及九月)剛好是今年陽明山國家公園降雨量的最低峰(乾季)及最高峰(濕季)。噴氣孔土壤呈極酸性，與前人所量測的噴氣孔周邊的裸地土壤和世界其他火山噴氣孔相比，酸鹼值均明顯更低。土壤質地屬於砂質壤土、壤質砂土或砂土，其餘的土壤化學性質當季的四處樣點互相比較，只有四磺坪第一季的硝酸氮含量及第二季的有機質含量明顯比其他地區來的高，其餘均無明顯差異。此外，同一個樣區兩季之間包括 pH 值、凱氏全氮及有機質有明顯變化。而在溫泉水化學性質方面，pH 與土壤一樣呈現極酸性，介於 1.26-2.67 之間，以大油坑處溫泉水酸性最低，因為其水樣 SO_4^{2-} 含量最高，小油坑水樣 SO_4^{2-} 含量比起其他 3 個水樣則較低。第一季大磺嘴的氮含量明顯高於其他地區及同樣地點第二季的銨離子低於檢測值。pH 值與硫酸根離子含量四個地區乾季與濕季明顯有差異。

兩季細菌群落結構以門的分類層級相比，最優勢的菌群是相同的，*Proteobacteria* 為最優勢、*Firmicutes* 次之再來是 *Actinobacteria*。以屬的分類層級來看，*Pseudomonas* 均為最優勢菌種，*Delftia* 次之。當季或是兩季之間四個採樣點的噴氣孔土壤及溫泉水細菌群落結構明顯有差異且第二季的物種豐度及歧異度都比第一季來的高。兩季樣本在 NMDS 圖上分佈呈現兩群，進一步以熱點圖檢視最優勢的 50 種菌種在兩季的動態變化，許多菌群的相對豐富度在乾濕季都有明顯的消長。所有樣本中 *Delftia* sp. 在兩季均為最優勢的菌種，兩種不同的 *Pseudomonas* sp. 則分別優勢的出現在乾濕季。*Sulfobacillus* sp. 則優勢出現在特定的樣區且兩季的相對豐富度明顯有消長。菌群在兩季的噴氣孔土壤及溫泉水的消長各有特定的型態。兩季之間噴氣孔土壤細菌群落結構的變異明顯受到環境的有機質、雨量及土壤 pH 影響($P < 0.05$)而兩季之間溫泉水細菌群落結構變異則受到 NH_4^+ 有明顯的影響($P < 0.05$)。

第二節 建議

建議事項內容

建議一：未來若能研究陽明山噴氣孔古細菌群落結構，可使微生物群落結構的資訊更完整。

建議性質：立即可行建議

主辦機關：陽明山國家公園管理處

協辦機關：國立屏東科技大學

說明：

陽明山國家公園擁有台灣特殊的火山地形，境內多處仍有後火山作用而形成噴氣孔。噴氣孔產生大量的 SO_4^{2-} ，造就高溫強酸的特殊環境，因此也孕育許多耐高溫強酸的微生物包括細菌與古細菌。本年度計畫已順利分析四處噴氣孔多項環境因素及細菌群落結構，但是古細菌群落結構卻仍然未知，噴氣孔的特殊環境正是古細菌喜愛的生長條件。因此若能了解古細菌群落結構，勢必能使噴氣孔微生物群落結構的資訊更完整。

建議二：長期觀測菌相的變化可以了解地質化學的變動

建議性質：中長期建議

主辦機關：陽明山國家公園管理處

協辦機關：國立屏東科技大學

說明：

本年度計畫已順利發現其溫度及雨量等氣候因素是否會影響菌相和土壤性質的結果。因全球暖化及溫室效應的影響，使氣候條件每年不穩定變化，所以建議以多年期經費長期持續委託學術單位進行陽明山噴氣孔及溫泉水觀測菌相的變化可以更了解地質化學的變動，並有助於生物多樣性之研究。

建議三：朝向環境宏觀基因體學研究，讓火山噴氣孔生地質化學的循環資訊更精確完整

建議性質：中長期建議

主辦機關：陽明山國家公園管理處

協辦機關：國立屏東科技大學

說明：

陽明山國家公園具有臺灣獨特的火山生態系，園區內仍有多處受到後火山作用形成噴氣口而造就特殊微環境，碳(C)和硫(S)循環是所有火山共同的生物地質化學循環，微生物正是扮演著調控火山生態系元素循環重要的角色，因此要了解生地質化學必定要先清楚知道該生育地所孕育的微生物。未來可以朝向環境宏觀基因體學(metagenomes)研究，讓火山噴氣孔生地質化學的循環資訊更精確完整。

第五章 參考文獻

- 陳正宏 (1990) 台灣之火成岩。經濟部中央地質調查所。137pp
- 內政部營建署 (1994) 陽明山國家公園。
- 余炳盛 (2004) 陽明山國家公園土壤重金屬含量調查及其地質意義之探討。陽明山國家公園管理處委託研究報告。
- 李重義 (2004) 外雙溪流域水生微生物的調查與監測。陽明山國家公園管理處委託研究報告。
- 李重義 (2006) 陽明山國家公園溫泉菌相的調查與應用。陽明山國家公園管理處委託研究報告。
- 李重義 (2009) 陽明山國家公園酸性溫泉物種調查及生存機制之研究。陽明山國家公園管理處委託研究報告。
- 顏江河 (2007) 陽明山國家公園火山土壤成份與植物適應性之研究。陽明山國家公園管理處委託研究報告
- 蔡呈奇 (2008) 陽明山國家公園全區土壤分析調查。陽明山國家公園管理處委託研究報告。
- 林子超、朱恩良、李苑瑋、顏江河 (2013) 陽明山火山噴氣口鄰近土壤與內生菌根菌調查。林業研究季刊 35: 241-252。
- 林正洪、李曉芬、黃有志、張麗琴 (2014) 來自火山的訊息- 與大屯火山群面對面。陽明山國家公園管理處出版。12pp
- Balser, T.C., and Firestone, M.K. (2005). Linking microbial community composition and soil processes in a California annual grassland and mixed-conifer forest. *Biogeochemistry* 73, 395-415.
- Bendia, A.G., Signori, C.N., Franco, D.C., Duarte, R.T.D., Bohannan, B.J.M., and Pellizari, V.H. (2018) A Mosaic of Geothermal and marine Features Shapes Microbial Community Structure on Deception Island Volcano, Antarctica. *Frontiers in Microbiology* 9, 899.
- Bertsch, P.M., and Morris, P.J. (2007). Isolation and characterization of four gram-positive nickel-tolerant microorganisms from contaminated sediments. *Microbial ecology* 53, 670-682.
- Brussaard L (1997) Biodiversity and ecosystem functioning in soil. *AMBIO* 26:563-570
- Bremner, J.M. (1965) Total nitrogen, inorganic forms of nitrogen, organic forms of nitrogen. In: C.A. Black (ed.). *methods of soil analysis part 2*. Am. Soc. of Agron., Inc., Madison, Wisconsin.
- Carney, K.M., and Matson, P.A. (2005). Plant Communities, Soil Microorganisms, and Soil Carbon Cycling: Does Altering the World Belowground Matter to Ecosystem Functioning? *Ecosystems* 8, 928-940.
- Chang, Y.H., Cheng, T.W., Lai, W.J., Tsai, W.Y., Sun, C.H., Lin, L.H., and Wang, P.L. (2012). Microbial methane cycling in a terrestrial mud volcano in eastern Taiwan. *Environmental microbiology* 14, 895-908.
- Chen, S.-C., Hsu, S.-K., Tsai, C.-H., Ku, C.-Y., Yeh, Y.-C., and Wang, Y. (2010). Gas seepage, pockmarks and mud volcanoes in the near shore of SW Taiwan. *Marine Geophysical Researches* 31, 133-147.
- Fraterrigo JM, Balser TC, Turner MG (2006) Microbial community variation and its relationship with nitrogen mineralization in historically altered forests. *Ecology* 87:570-579

- Freckman DW, Blackburn TH, Brussaard L, Hutchings P, Palmer MA, Snelgrove PVR (1997) Linking biodiversity and ecosystem functioning of soils and sediments. *AMBIO* 26:556-562
- Gee, G. W. and J. W. Bauder.1986. Partical-size analysis. In: A. Klute et al. (eds.). *Methods of soil analysis*.9:383-412
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, et al. (2011) *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0–1. Available: [http:// CRAN.R-project.org/package= vegan](http://CRAN.R-project.org/package=vegan)
- Kao-Kniffin J, Balser TC (2008) Soil fertility and the impact of exotic invasion on microbial communities in Hawaiian forests. *Microbial Ecology* 56:55-63
- Liu, C.C., Maity, J.P., Jean, J.S., Sracek, O., Kar, S., Li, Z., Bundschuh, J., Chen, C.Y., and Lu, H.Y. (2011). Biogeochemical interactions among the arsenic, iron, humic substances, and microbes in mud volcanoes in southern Taiwan. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 46, 1218-1230.
- MacDonald, D. C. (1977) *Methods of soil and tissue analysis used in the analytical laboratory*. Canadian Forestry Service Information Report MM-X-78.
- Mc Lean, E. O. (1982) Soil pH and lime requirement. In A. L. Page et al. (eds.) *Methods of soil analysis*. Part 2. 2nd ed. *Agronomy* 9: 199- 223.
- Milkov, A.V., Vogt, P.R., Crane, K., Lein, A.Y., Sassen, R., and Cherkashev, G.A. (2004). Geological, geochemical, and microbial processes at the hydrate-bearing Håkon Mosby mud volcano: a review. *Chemical Geology* 205: 347-366.
- Niemann, H., Lösekann, T., de Beer, D., Elvert, M., Nadalig, T., Knittel, K., Amann, R., Sauter, E.J., Schlüter, M., Klages, M., et al. (2006). Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature* 443: 854.
- Nelson, D.W., and L.E. Sommers. 1996. Total carbon, organic carbon, and organic matter. P.961-1010. In D. L. Sparks, A. L. Page, P. A. Helmake, R. H. Loeppert, P. N. Soltanopour, M.A. Tabatabai, C.T. Johnston, and M.E. Summer eds. *Method of Soil Analysis, Part3*.ASA and SSSA, Madison, WI, USA
- Schmidt, S.K., Gendron, E.M.S., Vincent,K., Solon, A.J., Sommers, P., Schubert, Z.R., Vimercati, L., Porazinska, D.L., Darcy, J.L. Sowell, P. (2018) Life at extreme elevations on Atacama volcanoes: the closest thing to Mars on Earth? *Antonie van Leeuwenhoek* 111:1389–1401.
- Siebert, J., and Hirsch, P. (1988). Characterization of 15 Selected Coccal Bacteria Isolated from Antarctic Rock and Soil Samples from the McMurdo-Dry Valleys (South-Victoria Land). *Polar Biology* 9:37-44.
- Smith, D.J., Griffin, D.W., and Schuerger, A.C. (2009). Stratospheric microbiology at 20 km over the Pacific Ocean *Aerobiologia* 26: 35-46.
- Stott, M.B., Saito, J.A., Crowe, M.A., Dunfield, P.F., Hou, S., Nakasone, E., Daughney, C.J., Smirnova, A.V., Mountain, B.W., Takai, K., et al. (2008). Culture-independent characterization of a novel microbial community at a hydrothermal vent at Brothers volcano, Kermadec arc, New Zealand. *Journal of Geophysical Research* 113.
- Schlegel HG (1992) *General Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 655.
- Soil Survey Staff (2014) *Keys to Soil Taxonomy* (12th edition). U.S. Dep. Agric., Soil Conserv. Serv., Washington, DC.
- Solon, A.J., Vimercati, L., Darcy, J.L., Aran, P., Porazinska, D., Dorador, C., Farias, M.E., and Schmidt,

- S.K. (2018). Microbial Communities of High-Elevation Fumaroles, Penitentes, and Dry Tephra "Soils" of the Puna de Atacama Volcanic Zone. *Microbial ecology* 76, 340-351.
- Tanikawa, T., Yamashita, N., Aizawa, S., Ohnuki, Y., Yoshinaga, S., and Takahashi, M. (2013). Soil sulfur content and its spatial distribution in a small catchment covered by volcanic soil in the montane zone of central Japan. *Geoderma* 197-198: 1-8.
- Team RDC (2011) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available: [http:// www.R-project.org/](http://www.R-project.org/).
- Tsui, C.-C., Tsai, C.-C., and Chen, Z.-S. (2013). Soil organic carbon stocks in relation to elevation gradients in volcanic ash soils of Taiwan. *Geoderma* 209-210, 119-127.
- Van Nostrand, J.D., Khijniak, T.V., Gentry, T.J., Novak, M.T., Sowder, A.G., Zhou, J.Z., Vestal JR, White DC (1989) Lipid analysis in microbial ecology. *Bioscience* 39:535-541.

陽明山國家公園管理處

107 年度「陽明山國家公園噴氣口及火山土壤微生物群落結構」

委託辦理案

期中會議紀錄

壹、時間：107 年 8 月 3 日（星期五）下午 2 時整

貳、地點：本處 2 樓會議室

參、出（列）席單位人員：詳如簽到簿

肆、宣布開會

伍、報告事項(略)

記錄:陳宏豪

陸、討論

(一)許正一教授：

- 1.請將初步結果及後續的收集數據能加以討論並與相關文獻作比較，而非只有原始數據的陳列，但幾乎沒有上述的說明。
- 2.建議多參考其他報告範例以改進本計畫報告內容的量及質。
- 3.宜確認重金屬分析結果的可信度。
- 4.土壤粒徑分析結果、土壤含水率請補齊，並使用一般通用土壤種類名詞。
- 5.可就全世界的安山岩噴氣口土壤的酸鹼值範圍、以及 thermal soil 溫度範圍進行相互比較俾利微生物相討論。
- 6.可與世界其他安山岩噴氣口土壤 Total Nitrogen 全氮及可獲得參考資料相互討論再來比較菌相。
- 7.採集土壤之有機質含量與蔡呈奇火山灰土壤差異再作比較說明。
- 8.溫泉水取樣標準程序如酸化處理應參考相關文獻進行及測定儀器選擇都應注意，方可與文獻結果相較。

受託單位回應:皆遵照辦理，另重金屬分析結果因分析過程或有誤差考量本項不屬本案合約內容，將作調整，有關土壤部分將補充如粒徑及其它相關資料。

(二)林乃君教授：

- 1.技術上在製備高通量定序樣品時，如何進行 QC？因為每一個 DNA Bolation Procedure 可能會有品質不好或不具代表性，要如何決定送樣 samples 要到甚麼樣的等級(應說明)。
- 2.報告書 p10 細菌預期條帶若是用 27F141R，應為 315bp 左右，而非 425bp。
- 3.火山土壤與溫泉水的菌種分離，額外添加 phytigel 的原因為何？CP.(7)參考文獻？口頭報告中說的是另一種 Solidifying reagent 修正 cacidophilic(R2A medium P.h 值)/thermophilic 菌種。
- 4.菌種分離的部分進度為何？培養條件、氧氣需求等如何決定？在文獻上可多作一些 search。
- 5.書面報告中的結果部分有點難看出是否有跟上進度，建議再多作一些說明。
- 6.菌種分離的成果不是很好，第二次採集會改進，但如何補強這方面微生物相在時間性的動態變化，請說明，合約中並沒有本項，因此可針對第二次來作菌種分離。

受託單位回應:

- 1.PCR 萃取不一定每次成功，若不明顯皆重新萃取 DNA 取得足夠量，非使用 PCR Procedure 去 emptyify。有關 QC 部分，通常在一開始很難知道代表性菌群，只能在定序完成後再作 Rarefaction curve，可得知樣本的取樣數是否具代表性足夠量，通常取至同數量及條件後再作比較。
 2. 係筆誤再作改正。
 3. phytigel 其實為商品名稱，其他解釋將再補充。
 4. 據相關文獻培養方式皆使用二氧化碳進行培養，因此本案採厭氧包進行培養，依委員建議多參考文獻進行補充並作為分離方式參考。但依約本團隊先將重點在菌群定序，此部分將盡力執行。
 5. 將進行補充。
 6. 第二次採集將會採用保溫瓶並立即至位於就近臺北市實驗室進行培養工作。
- (三) 華予菁課長:本案重在定序、透過文獻回顧觀察陽明山菌群季節性消長及群落結構了解，本案重金屬檢測項目數據因誤差且非屬本案契約項目，請受託單位再進行調整。

受託單位回應:遵照辦理。

(四)陳宏豪技士

- 1.補充高通量定序技術內容。
- 2.可多補充現地採樣點採集方式甚至其採樣品、培養過程照片。

受託單位回應:遵照辦理。

(五)主席

1 本案結果可依文獻回顧作討論以對國家公園有所助益。

2.請依規定格式撰寫報告書。

受託單位回應:遵照辦理。

柒、 決議

請受託單位採納與會者意見進行修正補充，期中會議修正後通過，主辦課室依契約辦理後續事宜。

捌、散會：下午 3 時 40 分。

國立自然科學博物館

陽明山國家公園管理處
107 年度「陽明山國家公園噴氣口及火山土壤微生物
群落結構」委託辦理案
期中會議
簽到簿

時間：107 年 8 月 3 日（星期五）下午 2 時整

地點：本處 2 樓會議室

主席：本處詹處長德樞 詹德樞 記錄：陳宏豪

出（列）席單位人員：

出席機關（單位）（人員）	職 稱	簽 到 處
國立臺灣大學農業化學系 李佳音	教授	請 假
國立臺灣大學農業化學系 林乃君	副教授	林 乃 君
國立臺灣大學農業化學系 許正一	教授	許 正 一
屏東科技大學森林系 （受託單位）	助 理 教 授	吳 羽 婷

出（列）席單位人員：	職 稱	簽 到 處
本處副處長盧淑妃	副處長	盧 淑 妃
秘書張順發	秘書	公假
企劃經理課		
環境維護課		
遊憩服務課	技士	吳世奇
解說教育課	課長	韓志武
小油坑管理站		
龍鳳谷管理站	主任	周俊賢
擎天崗管理站		
陽明書屋管理站		
保育研究課	課長 技士	吳子豪 謝祖豪

(107 年度「陽明山國家公園噴氣口及火山土壤微生物群落結構」委託辦理案期中會議
簽到簿)

陽明山國家公園管理處

107 年度「陽明山國家公園噴氣口及火山土壤微生物群落結構」

委託辦理案

期末會議紀錄

壹、時間：107 年 12 月 7 日（星期五）下午 2 時整

捌、地點：本處 2 樓會議室

玖、出（列）席單位人員：詳如簽到簿

壹拾、宣布開會

壹拾壹、報告事項(略)

記錄:陳宏豪

壹拾貳、討論

(一)李佳音教授：

1. 各種化學分析性質如 Ph 值、全氮量、有機質，本次陽明山的資料與國外土壤或溫泉水比較高低值時，必須注意文獻中呈現的分析值，它的環境參數也應一併說明。
2. 結果中：多重變異分析，樣區各種噴氣孔，雨季菌相組成差異、溫泉水微生物與群落結構等與環境變異的關係等這些結果必須空出使用的生物資訊方法及方法的參考文獻及年代版本。
3. 時間性的動態變化圖的結果，須將縱軸(如 bacterial community composotion)及細菌名稱重新打字呈現，字型大小須重新調整與圖比例要有一定大小便於閱讀。給圖制定的方法(生物資訊法)沒有空出來，圖說應仔細標明出圖型中的菌種代號，彩色代表意義。
4. 統計分析方法是幾重複？使用 $P < 0.05$ 或是 $P < 0.01$ 的比較標準？

實驗上都是至少 3 重複，使用 $P < 0.05$ 。

5. 結論中須清楚寫出：A 比 B 有明顯差異，是 A 比 B 高或低，高多少%或低多少%？

6. 優勢菌種代表意義？

樣本裡出現的相對豐富度大於 1%，代表該樣本主要的組成菌群。

7. NGS、His 使用的參數、如 >5000 reads 或 >20000 reads 等須說明。委託基隆米克斯分析上機的機型公司亦須交代。

受託單位回應：

(二)許正一教授(書面意見)

1. 請增列圖目錄、表目錄、摘要、結論。
2. 報告格式宜力求工整
3. 所有分析項目應有方法引用文獻
4. 分析數據宜統一有效數字
5. 土壤 pH 值分析值極低(<2.00)，因此使用前的校正緩衝液種類(pH 7 and 10?)應加以說明
6. 建議土壤有機質轉換為有機碳之表示方式，如此可得碳/氮比，用以對比可能菌群及其活性。
7. 土壤分析數據得到有機碳，氮及硫的比值，這些元素比例與微生物族群間的關係，可加以討論。
8. 如此低 pH 環境之氮型式一定受影響，故硝酸氮會遠高於銨態氮，而這種無機氮的分布，也應和第一點一起做討論，否則，只調查出火山口菌相，也分析了水，土性質，而其間的關係探索，不是只有相關性統計而已。

受託單位回應:

(三)林乃君教授:

1. 一般來說，進行 16S rRNA 基因高通量定序時，比較常用 V3-V4 region。前人研究顯示，341f/785r 的定序結果在 OUT 數量、豐度 Shannon diversity、專一性及重複來看是較 967f/1391r 及 799f/1193r (Thijs et al., 2017) 好的。因此想請問一下在計畫中，決定使用 968F/1381R 的原因為何?
2. 兩次採樣時所測得的土壤溫度，在幾個區有很大的差異。於第三章結果與討論中 (P. 20) 寫道 “...推測與所選的噴氣孔大小有關，...因此選了大油坑噴氣孔 5，屬於噴氣孔較小，因此溫度較低。”

所以是因為噴出的蒸氣較少，導致溫度低嗎？如果這樣話屆時若微生物相有差異，可能不是季節變異所致，而是溫度所導致？

*第一次與二採集的並非同一個噴氣孔，對嗎？

3. 分離菌種的部分 (雖然不是本研究主要目的，但若分離到代表性菌株將有助於後續的研究工作)
 - (1) R2A 和 hot-spring based media 上的菌落數量及型態是否有所差異，希望最後能有數據呈現。
由於溫泉水的溫度、成分及 pH 值明顯與 R2A 不同，因此很好奇在 2 種培養基上是否均能分離到代表性菌株。
 - (2) 圖 9 和 圖 10 上究竟有無菌落？是跟圖 8 一樣，無法判別菌落或 是土粒嗎？在顯微鏡下也無法分辨嗎？
 - (3) 溫泉水送回屏科大後的處理方式，為何選擇低高速離心收集菌體？不怕溫度及離心速對菌株的影響嗎？另外，選擇以 PBS 緩衝液回溶，是否有可能會造成破菌？(滲透壓或 pH 值差異太大)
 - (4) 只有用 放入厭氧包的條件培養菌落嗎？是否可能有好氧菌存的可能性？
4. 根據高通量定序結果分析所得數據，確實可以推測所用之離培養菌株的方式可能無法得到代表性菌株。例如以第一季四磺坪三個噴氣孔樣品所結果中推測 *Sulfobacillus* sp. 存在的可能性相當高。

然而該類菌株若無使用特殊的培養基及條件，是無法分離到的。未來建議可以根據高通量定序結果設計各種培養基與條件，以分離相關菌種並進行後續研究探討。

5. 如何推論 ” 時間性的動態變化 ” 及造成此變化的可能原因？

6. 目前僅剩不到一個月，是否能如期完成序列分析並得應有之結論？

受託單位回應：

(三) 華予菁課長：

1. 統計分析、迴歸日期討論時要做說明，火山土壤定義要作說明。

2. 土壤深度補充於材料方法中\

3. 4、9 月採樣期、溫度變化不同海拔環境要再整理表達。

受託單位回應:遵照辦理。

(四) 叢主任培芝

1 古細菌後續研究可以看出趨勢？理由？建議可以具體。

受託單位回應:遵照辦理。

2. 可多補充現地採樣點採集方式甚至其採樣品、培養過程照片。

受託單位回應:遵照辦理。

(五) 張順發秘書

1. 格式、材料方法 尚未完整須補充

2. p20 只有土壤座標，補座標系統、溫泉採樣點、環境、噴氣孔孔周圍可以補照片呈現。

3. 今年雨量與歷年雨量相較可以作區別

4. 結果建議 優勢菌的性質介紹是否有特殊功能可進行補充。

壹拾參、 決議

請受託單位採納與會者意見進行修正補充，結論中可分為科學性及對管理處經營管理部份分開撰寫，期末會議修正後通過，主辦課室依契約辦理後續事宜。

捌、散會：下午 3 時 40 分。



陽明山國家公園管理處
107 年度「陽明山國家公園噴氣口及火山土壤微生物
群落結構」委託辦理案
期中會議
簽到簿

時間：107 年 8 月 3 日（星期五）下午 2 時整

地點：本處 2 樓會議室

主席：本處詹處長德樞 詹德樞 記錄：陳宏豪

出（列）席單位人員：

出席機關（單位）（人員）	職 稱	簽 到 處
國立臺灣大學農業化學系 李佳音	教授	請 假
國立臺灣大學農業化學系 林乃君	副教授	林乃君
國立臺灣大學農業化學系 許正一	教授	許正一
屏東科技大學森林系 （受託單位）	助 理 教 授	吳羽婷

出（列）席單位人員：	職 稱	簽 到 處
本處副處長盧淑妃	副處長	盧 淑 妃
秘書張順發	秘書	公假
企劃經理課		
環境維護課		
遊憩服務課	技士	吳世奇
解說教育課	課長	韓志武
小油坑管理站		
龍鳳谷管理站	主任	周俊賢
擎天崗管理站		
陽明書屋管理站		
保育研究課	課長 技士	吳子昇 謝祖豪

(107 年度「陽明山國家公園噴氣口及火山土壤微生物群落結構」委託辦理案期中會議
簽到簿)