

陽明山國家公園溫泉微生物多樣性
與利用之研究

內政部營建署陽明山國家公園管理處委託研究報告

中華民國九十五年十二月

(國科會 GRB 編號)
PG 9503-0460

(本部研考資訊系統計畫編號)
095301020300G1003

陽明山國家公園溫泉微生物多樣性 與利用之研究

受委託者：財團法人私立東吳大學

研究主持人：李重義

內政部營建署陽明山國家公園管理處委託研究報告

中華民國九十五年十二月

目次

表次	III
圖次	V
摘要	VII
第一章 緒論	1
第一節 研究緣起與背景	1
第二節 研究預期目標	6
第二章 研究方法及過程	7
第一節 溫泉理化因子之蒐集	7
第二節 採樣	7
第三節 培養	7
第四節 抗微生物活性	8
第五節 分子生物學方法	9
第三章 研究發現	13
第一節 選擇陽明山國家公園內的代表性溫泉	14
第二節 培養實驗	26
第三節 應用潛力研究	34
第四節 確立分子生物學方法操作條件	36
第五節 溫泉中古菌與細菌之初步定量	42
第六節 溫泉中古菌與細菌之多樣性	47
第七節 溫泉中古菌與細菌 16S rRNA 基因片段序列的親源分析	57
第四章 結論與建議	59
第一節 結論	59
第二節 建議	61
第五章 參考文獻	63
附錄一：本研究採樣點之照片及基本資料	67

表次

表 1：酸性硫酸鹽氯化鈉泉的一般理化特性	21
表 2：酸性硫酸鹽氯化物泉的一般理化特性	21
表 3：強酸性硫酸鹽泉的一般理化特性	21
表 4：低酸性硫酸鹽泉的一般理化特性	22
表 5：中性至弱酸性碳酸鹽泉的一般理化特性	22
表 6：酸性硫酸鹽氯化物碳酸鹽泉的一般理化特性	23
表 7：各溫泉位置和特性	23
表 8：地熱谷溫泉在不同培養基中富積培養之結果	27
表 9：煥子坪溫泉在不同培養基中富積培養之結果	28
表 10：四磺坪溫泉在不同培養基中富積培養之結果	29
表 11：硫磺谷溫泉在不同培養基中富積培養之結果	30
表 12：媽祖窟溪邊池溫泉在不同培養基中富積培養之結果	31
表 13：媽祖窟浴池溫泉在不同培養基中富積培養之結果	31
表 14：羅漢窟浴池溫泉在不同培養基中富積培養之結果	32
表 15：鼎筆橋溫泉在不同培養基中富積培養之結果	32
表 16：比較各溫泉在不同培養基中富積培養之結果	33
表 17：地熱谷溫泉中具有分解能力微生物之富積培養結果	35
表 18：硫磺谷水泥池溫泉中具有分解能力微生物之富積培養結果	35
表 19：媽祖窟浴池男湯中具有分解能力微生物之富積培養結果	36
表 20：不同 primer 所得 PCR 產物對轉型效率的影響	41
表 21：純化 PCR 產物對轉型效率的影響	41
表 22：各溫泉樣本中古菌與細菌之初步定量	46

表 23：各溫泉樣本中古菌 RFLP 類型分佈與多樣性	53
表 24：各溫泉樣本中細菌 RFLP 類型分佈與多樣性	55
表 25：各溫泉樣本中古菌類型分佈	57
表 26：各溫泉樣本中細菌類型分佈	58
表 27：本研究所得溫泉樣本中古菌的分類地位	58

圖次

圖 1：陽明山國家公園內的溫泉地熱分布區	13
圖 2：陽明山國家公園區域溫泉資料之溫度與酸鹼度關	15
圖 3：陽明山國家公園區域溫泉碳酸根之有無與溫度和酸 鹼度之關係	16
圖 4：陽明山國家公園區域含碳酸根溫泉之碳酸根含量與 酸鹼度之關係	17
圖 5：陽明山國家公園區域不含碳酸根溫泉之氯離子含量 與酸鹼度之關係	18
圖 6：陽明山國家公園區域不含碳酸根溫泉之硫酸根含量 與酸鹼度之關	19
圖 7：本研究在陽明山國家公園區域的溫泉採樣分佈	26
圖 8：比較不同市售土壤中 DNA 萃取套組的效果	37
圖 9：測試不同 Bacterial primers 對於放大樣品 DNA 中 16SrRNA 基因片段的效果（一）	38
圖 10：測試不同 Bacterial primers 對於放大樣品 DNA 中 16S rRNA 基因片段的效果（二）	39
圖 11：測試 Archerial primers 對於放大樣品 DNA 中 16S rRNA 基因片段的效果	40
圖 12：不同溫泉樣品 DNA 中細菌與古菌 16S rRNA 基因 片段的放大結果	43
圖 13：利用 PCR 進行溫泉樣品 DNA 中 16S rRNA 基因片 段的定量結果（一）	44
圖 14：利用 PCR 進行溫泉樣品 DNA 中 16S rRNA 基因片 段的定量結果（二）	45

圖 15：古菌的 16S rRNA 基因片段用 Rsa I 切割的 RFLP 類型	48
圖 16：古菌的 16S rRNA 基因片段用 Sau3A I 切割的 RFLP 類型	48
圖 17：古菌的 16S rRNA 基因片段用 Hha I 切割的 RFLP 類型	49
圖 18：細菌的 16S rRNA 基因片段用 Rsa I 切割的 RFLP 類型	50
圖 19：細菌的 16S rRNA 基因片段用 Sau3A I 切割的 RFLP 類型	51
圖 20：細菌的 16S rRNA 基因片段用 Hha I 切割的 RFLP 類型	52

摘 要

關鍵詞：陽明山國家公園、溫泉、微生物多樣性、古菌

一、研究緣起

過去有關陽明山國家公園內生物保育的研究偏重動、植物。然而陽明山國家公園境內有許多溫泉，其中或有許多未被發現的本土細菌物種，甚至新種值得研究。本研究乃針對陽明山國家公園內各個具有代表性的主要溫泉之嗜熱菌菌相及其應用潛力進行調查，以期建立有關溫泉微生物之基礎資料，俾供經營管理參考並利爾後應用。

二、研究方法及過程

1. 文獻蒐集與分析：蒐集前人研究報告，整理各個溫泉的理化資料，據以選擇欲進行研究的溫泉點。

2. 採集溫泉樣品：採樣位置使用衛星定位儀測量縱座標與橫座標並與前人資料比對。實際採樣時測定溫度，並攜帶溫泉水回實驗室，於室溫下測定 pH 值。

3. 培養實驗：採用 DSMZ Medium 88 (Sulfolobus medium) 為基礎培養基，添加不同碳源，於 70°C 振盪培養，並以次培養測微生物生長的方式檢驗微生物對各種碳源的利用能力。

4. 多樣性分析：分別使用 bacterial primers 及 archaeal primers 以 PCR 方式放大溫泉樣品中的 16S rRNA 基因片段，經過分子選殖後，以 RFLP 類型分群進行多樣性分析。再將基因片段定序，送 NCBI 網站進行比對。

三、重要發現

1. 陽明山國家公園內溫泉酸鹼度範圍在 pH1.5~7，且主要集中在

偏酸性的 pH1.5~3.5 及偏中性的 pH5~7 兩個範圍；前者溫度範圍較大，從約 40°C 到接近 100°C，而後者溫度範圍較小且較低，從約 35°C 到約 65°C。含碳酸根的溫泉集中在偏中性範圍且溫度較低，不含碳酸根（但含硫酸根及氯離子）的溫泉則散佈在各種溫度與酸鹼度範圍。

2. 強酸性溫泉(pH1-2)內的微生物只在含 peptone 和 yeast extract 的培養基內才有明顯生長；弱酸性溫泉（pH3-5）內的微生物在複合培養基及不含有機氮源而以 glucose、sucrose、xylose 為唯一碳源的培養基中都有明顯生長。中性含碳酸溫泉內的微生物只在 pH5 和 pH7 下有明顯生長。

3. 測試溫泉樣品中的微生物在測試條件下皆不會產生對於格藍氏陰性細菌 *Escherichia coli*、格藍氏陽性細菌 *Staphylococcus aureus*、和酵母菌 *Candida albicans* 有抑制活性的物質。

4. 酸性溫泉具有開發分解 starch、cellulose、chitin 微生物的潛力。

5. 不同溫泉中的細菌和古菌相對含量並不相同。強酸性溫泉中的微生物含量非常低，但細菌的相對量似乎略多。弱酸性溫泉中的微生物含量相當多且似乎古菌較多。接近中性的溫泉則以細菌較多。

6. 煨子坪人工池中的古菌多樣性最大，與煨子坪大露頭中古菌多樣性的相似度最低。硫磺谷水泥池中細菌的多樣性最大。煨子坪人工池與煨子坪大露頭、地熱谷的細菌相完全不同。

7. 陽明山國家公園酸性溫泉中的古菌絕大多數都屬於未曾被分離鑑定過的菌株。少數已知種名的古菌皆屬於泉古菌門（Crenarchaeota）的暖球形菌目（Caldisphaerales）和硫化葉菌目（Sulfolobales）。煨子坪人工池有相當高比例的細菌菌株屬於未曾被分離鑑定者。其他酸性溫泉則發現許多已知種名的細菌皆屬於嗜甲基菌屬（*Methylophilus*）和假單胞桿菌屬（*Pseudomonas*）。

四、主要建議事項

1. 將溫泉微生物基本資料納入陽明山國家公園教育解說資料。
2. 委託學術機構從陽明山國家公園溫泉內長期進行微生物分離與分類研究，以期發現許多新種的古菌和細菌。
3. 委託學術機構從陽明山國家公園溫泉內分離具有降解能力的微生物，以期開發具有工業與環保應用潛力的嗜熱嗜酸菌生物資源。
4. 委託學術機構對陽明山國家公園溫泉內微生物的多樣性進行更廣泛的監測以期歸納引起變化的因素。

ABSTRACT

Keywords: Yangminshan Nation Park, hot spring, microbial biodiversity, Archaea

1. Introduction

In the past times, research on conservation of organisms in the Yangminshan Nation Park was mainly restricted to studies of plants and animals. There are many hot springs in this Nation Park. Perhaps there are many new species of microorganisms to be discovered. The purpose of the present study is to investigate the microbial diversity in some selected hot springs. The potential of utilization of microorganisms in hot springs is also studied.

2. Methodology

1. Literature analysis: Research reports concerning physical and chemical data of hot springs in the Yangminshan Nation Park were collected. Study sites were chosen according to results obtained by analysis of those data.

2. Sampling: Position of each study site was located by using the Global Positioning System. Temperature was determined *in situ* while pH was measured after bringing spring water back to laboratory.

3. Cultivation experiments: Different carbon sources were added into DSMZ Medium 88 (Sulfolobus medium) which was used as the basal medium. Incubation was made at 70 °C with shaking. Growth of subculture was used to determine ability of using each carbon source.

4. Analysis of biodiversity: Fragment of 16S rRNA gene was amplified by using bacterial primers and archaeal primers respectively. After molecular cloning, RFLP type of every cloned partial 16S rRNA gene was determined. It was used to calculate the biodiversity indexes. Finally sequence of every selected 16S rRNA

gene fragment was send to web site of NCBI and compared with the data base.

3. Results

1. The pH of hot springs in the Yangminshan Nation Park is scattered between 1.5-7 with two main groups ranging from 1.5-3.5 and 5-7 respectively. The surface temperature of the former group is varied in a larger range from about 40 °C to about 100 °C, while the latter group has a narrow temperature range, i.e. from about 35 °C to about 65 °C. Springs containing carbonate ion have neutral pH and lower temperature. Both temperature and pH values of springs not containing carbonate ion, but containing sulfate and chloride ion, are scattered in various ranges.

2. Microorganisms in strongly acidic (pH1-2) hot springs showed significant growth only in complex medium containing both peptone and yeast extract, while those in weekly acidic (pH3-5) springs could grow both in complex medium and mineral mediums containing glucose, sucrose, xylose as the sole carbon source. Microorganisms in carbonated neutral hot springs could grow only in pH5 and pH7.

3. Microorganisms in all tested hot springs did not produce antibiotic substances against Gram negative bacterium *Escherichia coli*, Gram positive bacterium *Staphylococcus aureus*, and yeast *Candida albicans* under experimental conditions.

4. There is a positive potential to develop microorganisms processing starch, cellulose, or chitin-degrading capability in acidic hot springs.

5. Various hot springs showed different relative amount of Bacteria and Archaea. Strongly acidic hot springs showed very low amount of microorganisms with a little more Bacteria. Weekly acidic hot springs had large amount of microorganisms with a much better more Archaea. Hot springs near neutral pH range had a great deal of Bacteria.

6. Biodiversity of Archaeal and Bacterial RFLP patterns of the artificial pool and natural spring-water outlet in Gan-Tsz-Pin area, cement pool in Sulfur Valley,

and Ground-Hot Valley was investigated. The similarity between paired sites was calculated. It was found that artificial pool in Gan-Tsz-Pin showed the largest Archaeal biodiversity and cement pool in Sulfur Valley showed the largest Bacterial biodiversity. Both Archaeal and Bacterial flora in artificial pool in Gan-Tsz-Pin were significantly different with other sites.

7. Most of Archaeal clones studied in acidic hot spring in the Yangminshan Nation Park were belonged to uncultured archaeon clones. A few of clones with identified names were belonged to Caldisphaerales and Sulfolobales. Both of them are in the phylum of Crenarchaeota. Great many of bacterial clones found in artificial pool in Gan-Tsz-Pin were uncultured bacterium clones. Many *Methylophilus* and *Pseudomonas* clones were found in other acidic hot springs.

4. Suggestions

1. To collect and integrate information of microorganisms in hot springs and put it into the educational material of the Yangminshan Nation Park.

2. To establish a long-term research on the isolation and phylogenic study of hot spring microorganisms in respect of finding various new species of Archaea and Bacteria.

3. To study the capability of degradation of hot spring microorganisms in respect of developing bio-resource with industrial and environmental potential.

4. To perform a broader and longer range of monitoring the biodiversity of microorganisms in hot springs in the Yangminshan Nation Park.

第一章 緒論

第一節 研究緣起與背景

一、研究緣起

過去有關陽明山國家公園內生物保育的研究偏重動、植物。然而陽明山國家公園境內有許多溫泉，其中或有許多未被發現的本土細菌物種，甚至新種值得研究。本研究乃針對陽明山國家公園內各個具有代表性的主要溫泉之嗜熱菌菌相及其應用潛力進行調查，以期建立有關溫泉微生物之基礎資料，俾供經營管理參考並利爾後應用。

二、研究主題背景及有關研究之檢討

微生物包括原核 (prokaryotic) 的細菌與真核的 (eukaryotic) 真菌和原生生物等各式各樣的生物。它們與動物、植物一同構成了繁華的生物世界。一般所謂的細菌 (bacteria) 又包括細菌域 (Bacteria) 和古菌域 (Archaea) 兩大類的原核生物 (prokaryotes)，它們在地表生態系統中主要扮演分解者的角色，對於地球上物質循環具有關鍵性的作用，更可以穩定自然環境的平衡。細菌與其它類別的微生物相比，不但在自然環境中的密度最大，種類也最多；甚至有可能是地球上數量和歧異度最大的一類生物 (Torsvik *et al.*, 2002)。然而，不同於動物與植物，細菌無法光靠肉眼便可看到；且不同菌種之間生理特性差異極大，培養方式也不盡相同，甚至許多生存於自然環境中的細菌無法用已知的方法培養而獲得，即所謂未能培養 (uncultivated)。因此，人們對於生活在自然環境中細菌的瞭解可謂相當欠缺。

自然界中許多環境因子會對生物（尤其是微生物）的活力及演化產生重大影響。這些環境因子包括日照、溫度、氧化還原電位、酸鹼度、鹽度、水壓、水活性、養份濃度、電磁及游離輻射等，其中以溫度最易被人類感覺和測定，因此成為最受重視的一項環境因子。而高溫環境牽涉到生命存在的極限條件，因而格外受到重視。

自然界高溫環境的成因可粗略分為太陽輻射、燃燒、地熱和人為熱源等四大類。太陽輻射可使土壤溫度達到 60°C，但僅限於陽光照射的數小時內。燃燒現象通常是由微生物對有機物質氧化釋放熱量而造成，例如乾草堆，甚至垃圾的自熱現象，溫度常達 70°C 或更高；但隨著可燃物減少，溫度亦無法長期維持。人類活動的大型熱源包括各式工廠和發電廠，其對生態雖有相當程度的影響，但也只有百餘年的歷史。唯獨地熱活動除了普遍存在於世界各地，對生態有一定影響外；因其追溯時代久遠，對生物亦有演化上的意義。此外伴隨火山活動的溫泉常達到 90-100°C 的沸騰溫度（隨所處位置的地表高度而異），甚至超過 100°C（海底溫泉），近數十年來卻發現細菌可在其中生存，因而開啟人們對生物生存溫度上限的認識與探究的興趣 (Brock, 1978)。

Carl Woese 從 1970 年代開始研究細胞核糖體 16S rRNA 的核苷酸序列，從而發現生物世界依演化觀點可分為古菌 (Archaea)、細菌 (Bacteria) 和真核生物 (Eucarya) 三大領域 (Woese *et al.*, 1990)。Thomas D. Brock 根據各方的報告指出，高等真核生物（包括動物和植物）能夠生活的最高溫度為 50°C，藻類和真菌等真核微生物的生活上限溫度較高，約為 60°C，超過此溫度能生活的生物則完全屬於原核生物（包括古菌及細菌）(Brock, 1985)。一般而言，最適（快）生長溫度超過 40°C 者被稱為嗜熱生物 (thermophiles)。由於許多嗜熱菌也能在低於 50°C 下生長，因此將生活溫度下限超過真核生物生活上限溫

度 (50~60°C) 的嗜熱菌稱為絕對嗜熱菌 (obligate thermophiles) 或極端嗜熱菌 (extreme thermophiles) (Brock, 1986), 亦有將生活溫度下限超過 40°C 者稱為極端嗜熱菌者 (Cowan, 1992a)。某些絕對嗜熱菌更能在接近 100°C 的溫度生長, 其最適 (快) 生長溫度超過 80°C, 被稱為超級嗜熱菌 (hyperthermophiles) (Stetter, 1998)。

嗜熱菌的天然地熱棲息所 (geothermal habitats) 隨酸鹼度的不同, 可分為鹼性熱泉與酸性熱泉兩大類 (Cowan, 1992a)。當大量地下水滲入地底受岩漿 (magma) 加熱回到地表, 由於溶解相當多的礦物質和二氧化碳 (pKa of bicarbonate = 6.3; pKa of carbonate = 10.2), 使得泉水呈現中性到鹼性 (pH 6-9); 主要的陰離子為氯離子和碳酸氫根。地表的鹼性熱泉常位於小山丘的底部, 水量充沛且水溫穩定。海底熱泉湧口 (hydrothermal vents) 則由鹽份高的海水取代地下水而形成, 由於水壓的關係溫度可超過 100°C, 而硫化氫含量的多寡也使得酸鹼度在微酸到微鹼性之間 (pH 5-8)。至於酸性熱泉的成因則是由於地下水水量較小或熱源較接近地表, 多出現在火山區 (volcanic areas)。伴隨地熱活動釋出地面的硫化氫氧化成硫磺再進一步氧化 (微生物作用或非生物作用) 產生硫酸 (pKa of sulfate = 1.8), 溶解於地表水或少量上升的地下水使得酸鹼度達到強酸性 (pH 1-2)。酸性熱泉水量不穩定, 有時僅形成噴氣孔 (fumaroles), 因此水溫變化較大。酸性熱泉除了富含硫及鐵之外, 其他礦物質含量較少。

Thomas D. Brock 在美國國家科學基金支助下, 於 1965 年開始研究黃石公園中嗜熱菌的生態和演化關係, 並在往後歲月中旁及嗜熱菌的生化、生理和分類研究, 成就斐然。近年來許多嗜熱菌被逐一發現 (Stetter, 1986, 1998; Adams, 1995), 有關嗜熱菌在基礎生物學及生物技術應用的研究更受到廣泛重視 (Brock, 1986; Bergquist and Morgan,

1992; Cowan, 1992a, b; Norris, 1992)。

自然環境中微生物種類及數量皆甚龐大，且許多微生物不易培養，欲研究生態系統中微生物相的組成與變化，有其實質上的困難。近年由於分子生物學技術的近展，不需要培養微生物且分析效率高的方法被用於許多地區溫泉中嗜熱菌菌相的研究，例如美國黃石公園 (Hugenholtz *et. al.*, 1998; Boomer *et. al.*, 2002)，日本 (Takai and Sako, 1999)，冰島 (Hjorleifsdottir *et. al.*, 2001)，印尼西爪哇 (Baker *et. al.*, 2001)，印度 (Ghosh *et. al.*, 2003)，泰國 (Kanokratana *et. al.*, 2004)，義大利拿波里 (Kvist *et. al.*, 2005)。透過這些方法並且發現了許多未知的分類世系 (lineages)。

台灣位於西太平洋的火山島弧中花彩列島上，境內多溫泉，有記錄者近百處。然孕育於火山區的溫泉僅 15 處，其中絕大多數位於北台灣的大屯火山群，而成為陽明山國家公園最具獨特風格的自然景觀 (楊，1992)。另兩處則分佈在龜山島及綠島。陽明山溫泉大多數為酸性溫泉，酸鹼度可達 pH 2 左右，但也有 pH 值介於 6-7 之間的碳酸泉。迄今為止，有關陽明山國家公園之生態研究包括各種動物資源調查，植被分析，苔蘚地衣類資源調查等，皆屬於真核生物的範疇，且調查範圍以涵蓋整個國家公園為主。然而對於最具特色的溫泉，其內獨具的溫泉微生物之調查工作則十分缺乏。

台灣過去有關溫泉中微生物的研究，大多屬於零星式的調查或培養分離。(1) 藻類方面：早期曾有關於藍綠藻、矽藻、眼虫藻、紅藻之調查 (張，1966)；近年則有藍球藻、火山頁藻 (梁，1990) 及矽藻 (林，1996) 之研究；及針對陽明山紅藻 *Cyanidium caldarium* (約在 50°C、pH 2 的環境下生長) 生理、生化的研究 (阮，1994；江，1998)。(2) 嗜熱真菌：雖有一些研究，但針對溫泉的則限於烏來溫

泉 (Wu *et. al.*, 2000)。(3)嗜熱菌方面：包括耐熱酵素生產菌的研究，如：生產澱粉酶的 *Bacillus stearothermophilus* (陳, 2000)、生產酯解酶的 *Bacillus acidocaldarius* (蔡, 2000)、生產葡萄糖異構酶的 *Bacillus acidocaldarius* (柯, 2000)、生產洋菜酶的 *Alterococcus agarolyticus* (李, 2001)；亦有發現新種的研究，如：陽明大學程樹德教授指導其學生在陽明山溫泉分離嗜熱古菌而發現 *Sulfolobus yangmingensis* (Jan *et. al.*, 1999)、台灣大學謝文陽教授指導其學生在綠島海岸溫泉分離各種嗜熱菌而發現 *Alterococcus agarolyticus* (Shieh and Jean, 1998)。

近年來已有一些採用分子生物學技術進行溫泉微生物相的研究，如：大規模分離培養台灣各地 19 個溫泉中的嗜熱細菌，再利用 16S rDNA 分子序列與微生物資料庫進行比對，主要目的在於建立台灣嗜熱菌種源庫 (陳, 2002)，其中只選擇了兩個位於大屯火山群的溫泉：北投溫泉 (42-78°C, pH 3.3-5.9) 和陽明山溫泉 (41-80°C, pH 4.5-5.8)。另外，也有利用變性梯度膠體電泳 (DGGE) 分析台灣三個溫泉 (馬槽、關仔嶺、廬山) 樣本 DNA 中 16S rDNA 變異區序列，並配合 16S rDNA 完整分子序列分析，以瞭解溫泉中細菌群落的組成 (何, 2004)，其中位於大屯火山群的溫泉為馬槽溫泉 (pH 2-4)。

過去有關陽明山國家公園內生物保育的研究偏重動、植物。然而陽明山國家公園境內有許多溫泉，卻尚未建立有關溫泉微生物之完整基礎資料。其中或有許多未被發現的本土細菌物種，甚至新種值得研究。此外，由於嗜熱微生物的應用價值漸漸受到重視，因此溫泉嗜熱菌亦成為重要的生物資源，值得調查與蒐集。

本研究乃計畫針對陽明山國家公園內各個具有代表性的主要溫泉之嗜熱菌菌相及其應用潛力進行的調查，以期建立有關溫泉微生物

之基礎資料，俾供經營管理參考並利爾後應用。

第二節 研究預期目標

本研究預期目標在於建構陽明山國家公園內溫泉微生物相之種類分佈、生態特性與利用之基礎資料。

第二章 研究方法及過程

第一節 溫泉理化因子之蒐集

蒐集前人研究報告，整理各個溫泉的理化資料，據以選擇欲進行研究的溫泉點。採樣位置使用衛星定位儀（CPS 12 XL, GARMIN）測量縱座標與橫座標。實際採樣時測定溫度，並攜帶溫泉水回實驗室，於室溫下測定 pH 值。

第二節 採樣

一、培養用樣品

依據酸鹼度、溫度、礦物質含量挑選具有代表性的主要溫泉，採取約含等量水及表層底泥（0-10 cm）的樣品，放到 50 毫升塑膠製無菌離心管中，置於保溫瓶，於三小時內帶回實驗室，立即進行培養實驗。

二、萃取 DNA 之樣品

用於 DNA 萃取之樣品，於 4°C 短暫保存或於 -20°C 長期冷凍保存。

第三節 培養

一、主培養

取 5 毫升混合均勻的樣品懸浮液，加到裝有 15 毫升富積培養液

的 50 毫升有蓋離心管中，在 70°C 振盪培養 7 天。

二、次培養

主培養液靜置 10 分鐘後，取 1 毫升上層液，接到含 15 毫升富積培養液的 50 毫升有蓋離心管中，測定起始的混濁度 (OD₆₆₀)，然後於 70°C 振盪培養。培養 7 天後測定培養液的混濁度。

三、培養基

基礎培養基為 DSMZ Medium 88 (Sulfolobus medium)，其組成為每公升含有：1.3g (NH₄)₂SO₄, 0.28g KH₂PO₄, 0.25g MgSO₄·7H₂O, 0.07g CaCl₂·2H₂O, 0.02g FeCl₃·6H₂O, 1.80mg MnCl₂·4H₂O, 4.50mg Na₂B₄O₇·10H₂O, 0.22mg ZnSO₄·7H₂O, 0.05mg CuCl₂·2H₂O, 0.03mg Na₂MoO₄·2H₂O, 0.03mg VOSO₄·2H₂O, 0.01mg CoSO₄。pH 調成 2.5, 5.0, 7.0。另外分別添加 1g/L 的 Peptone 和 Yeast extract、glucose、xylose 或 sucrose。進行分解試驗時，基礎培養基 (pH 5.0) 添加 0.1g/L 的 Peptone 和 Yeast extract，然後再分別添加 1g/L 的 starch、xylan、cellulose、chitin、nonylphenol 和 phenanthrene。

第四節 抗微生物活性

一、受測微生物

使用格藍氏陰性細菌 *Escherichia coli* CCRC11848、格藍氏陽性細菌 *Staphylococcus aureus* CCRC10781、和酵母菌 *Candida albicans* CCRC20511。

二、分析方法

將前述溫泉樣品主培養液，離心（6000rpm, 30min），沈澱物用 1mL 甲醇萃取；上清液用鹽酸調 pH 到 2 以下然後用 1mL 乙酸乙酯萃取，取出有機層用氮氣吹乾再溶於 1mL 甲醇。

取 OD₆₆₀ 為 0.1 的受測微生物培養液（培養於 LB）塗抹到洋菜平板培養基上，取 30μL 上述甲醇溶液滴到無菌的濾紙圓片（0.5cm），再將濾紙圓片貼到塗有菌液的平板培養基，於 37°C 培養 1 天，然後觀察抑菌圈。

第五節 分子生物學方法

一、萃取 DNA

使用市售土壤中 DNA 萃取套組 PowerSoil™ DNA isolation kit 及 Soil Genomic DNA purification kit，按照廠商說明步驟進行操作，但溫泉沈積物用量為 1 克。

二、放大 16S rRNA 基因片段

實驗中所使用的 primer 如下：

Primer	Sequence	Reference
Bacterial forward		
Eubac27F or 8F (8-27 <i>E. coli</i> position)	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	DeLong (1992)
27f	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Lane (1991)
Bacterial reverse		
1492R (1492-1510)	5'-GGT <u>T</u> ACCTTGTTACGACTT	DeLong (1992)
1510R (1495-1510)	5'-GGC <u>T</u> ACCTTGTTACGA	本研究
1492r (1492-1513)	5'-TACGGY <u>T</u> ACCTTGTTACGACTT	Lane (1991)
1512R (1492-1512)	5'-ACGGY <u>T</u> ACCTTGTTACGACTT	本研究

Bacteria reverse 907r or (907-926) 926R (907-926)	5'-CCGTCAATTC <u>M</u> TTT <u>R</u> AGTTT 5'-CCGTCAATTC <u>C</u> TTT <u>G</u> AGTTT	Lane (1991) 本研究
Archaeal forward Arch21F (7-26) Arch26f (11-26)	5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA 5'-GGTTGATCCYGCCGGA	DeLong (1992) 本研究
Archaeal reverse Arch958R (958-976) Arch973R (958-973)	5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT 5'-GGCGTTGAMTCCAATT	DeLong (1992) 本研究

M = C, A; Y = C, T

PCR 條件：

94°C, 5min

30 cycles of 94°C, 1min; 57°C, 1min; 72°C, 1.5min

72°C, 2min

三、選殖 16S rRNA 基因片段

將 PCR 產物進行洋菜凝膠電泳 (1.1%)，確認片段大小後連接到 pGEM-T Easy Vector (Promega, USA)。連接產物再使用熱休克法轉形 *E. coli* JM109 勝任細胞。轉形株在含有 ampicillin (100µg/mL) 並添加 100µL 100mM IPTG 及 20µL 40 mg/mL X-gal 的 Luria-Bertani agar plates 進行藍/白菌落篩選。利用接種針挑出白色單一菌落至無菌水，95°C 加熱 5 分鐘後利用 M13/pUC sequencing primers 進行 PCR，再以電泳確認選殖片段大小正確。

四、16S rRNA 基因片段的限制酶片段長度多型性分析及序列分析

將 M13/pUC sequencing primers 放大的 16S rRNA 基因片段分別用 Rsa I、Sau3A I、Hha I 進行分解，然後以 1.6% 洋菜凝膠進行電泳分析，以肉眼觀察將不同片段長度多型性予以分類。最後將同一類型的 16S rRNA 基因片段送交廠商進行序列分析。

五、16S rRNA 基因片段序列的親源分析

將 16S rRNA 基因片段序列送到 NCBI 網站上進行比對。使用 clusterW 進行 alignment，再使用 phylip 軟體繪製系統樹(Maximum Likelihood)。

六、生物多樣性分析

豐多度(Richness, S):樣本中選殖到的 16S rRNA 基因片段的全部 RFLP 類型數。

歧異度 (Simpson's diversity index, D) :

$$D = 1 / \sum P_i^2 \quad P = \text{Number of clones in a given RFLP type} / \text{Total number of clones}$$

均勻度 (Equitability or Evenness, E_D) :

$$E_D = D / D_{\max} = D / S$$

兩個採樣點之間的相似度 (Similarity between sites α and β , $d^{\alpha\beta}$)

$$d^{\alpha\beta} = (\sum P^\alpha P^\beta) / (\sum (P^\alpha)^2 \sum (P^\beta)^2)^{1/2}$$

第三章 研究發現

第一節 選擇陽明山國家公園內的代表性溫泉

在陽明山國家公園內，溫泉和噴氣孔的分布與金山斷層的走向有著密切的關係。沿著北投到金山之間有一條長約十八公里，寬約三公里，散布著硫磺噴氣孔的狹長地帶，此帶為本區重要的溫泉地熱分布區（圖 1）。

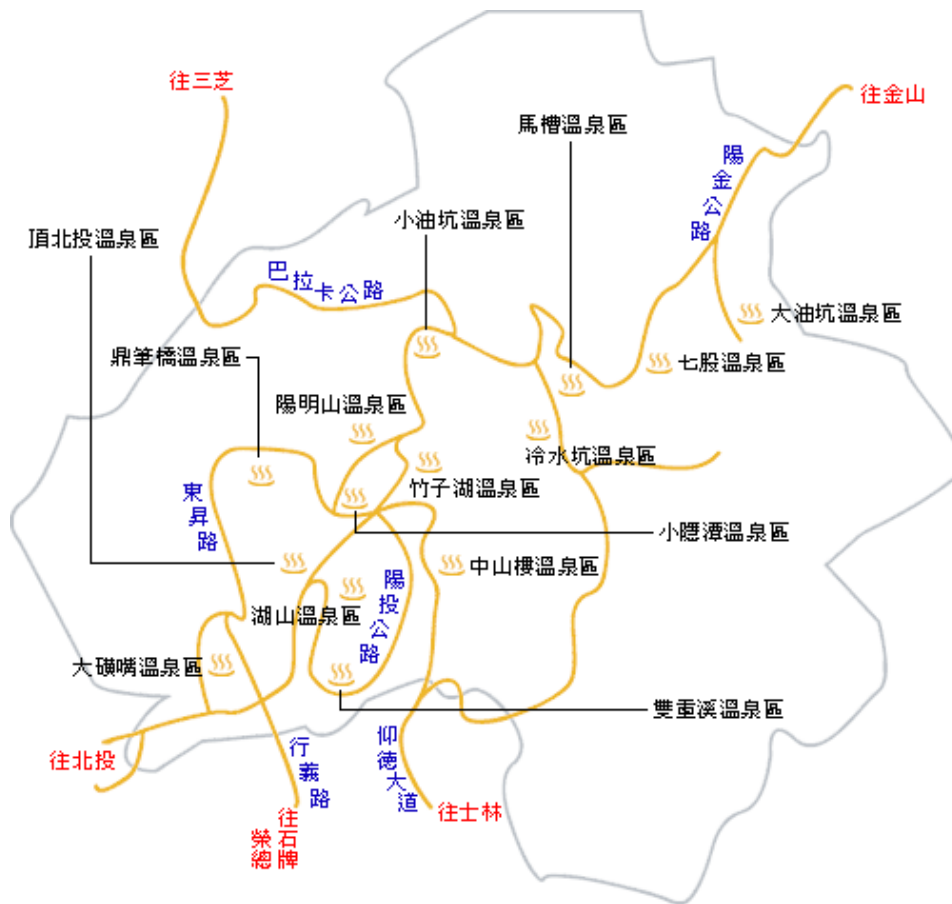


圖 1：陽明山國家公園內的溫泉地熱分布區

根據前人調查陽明山國家公園附近溫泉的理化資料（程，1987；黃，1997；翁，2001；陳，2002；宋，2005）整理後發現：

(1)溫泉酸鹼度範圍在 pH1.5~7，且主要集中在偏酸性的 pH1.5~3.5 及偏中性的 pH5~7 兩個範圍；且偏酸性溫泉的溫度範圍較大，從約 40°C 到接近 100°C，而偏中性溫度的溫度範圍較小且較低，從約 35°C 到約 65°C（圖 2）。

(2)含碳酸根的溫泉集中在偏中性範圍且溫度較低，不含碳酸根（但含硫酸根及氯離子）的溫泉則散佈在各種溫度與酸鹼度範圍（圖 3）。

(3)含碳酸根的溫泉，其碳酸根含量愈高則 pH 值愈高（圖 4）。

(4)不含碳酸根的溫泉，其 pH 值與氯離子含量關係不明確（圖 5）；但硫酸根濃度愈高 pH 值愈低（圖 6）。

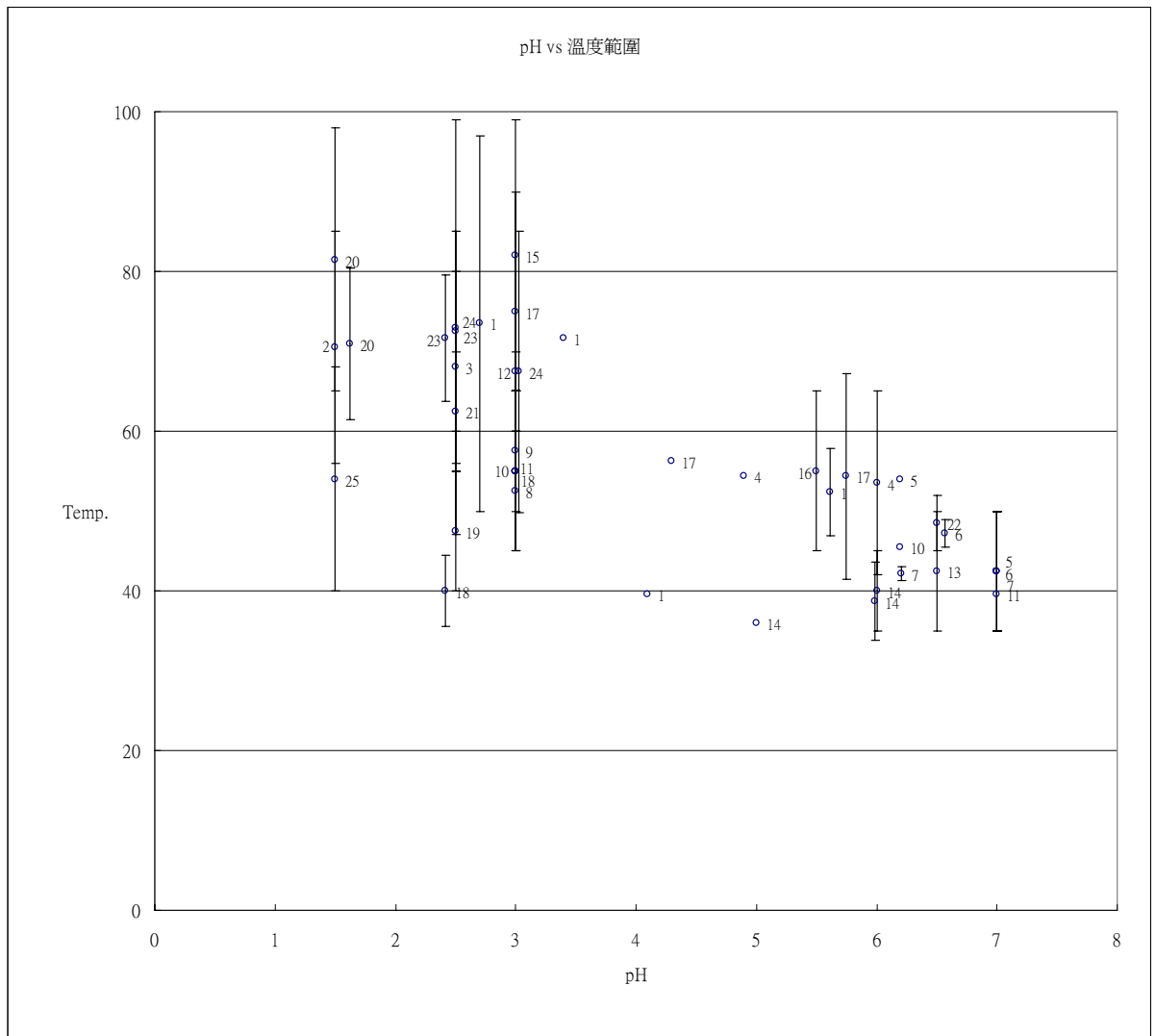


圖 2：陽明山國家公園區域溫泉資料之溫度與酸鹼度關係

- 1.硫磺谷; 2.行義路; 3.龍鳳谷; 4.雙重溪; 5.頂北投; 6.鼎筆橋; 7.湖山; 8.小隱潭;
 9.陽明路; 10.中山樓; 11.陽明山; 12.竹子湖; 13.胡宗南墓; 14.冷水坑; 15.小油
 坑; 16.後山; 17.馬槽; 18.七股; 19.翠林橋; 20.大油坑; 21.磺溪; 22.下七股; 23.
 八煙; 24.四磺坪; 25.庚子坪; 26.地熱谷; 27.大埔; 28.金山

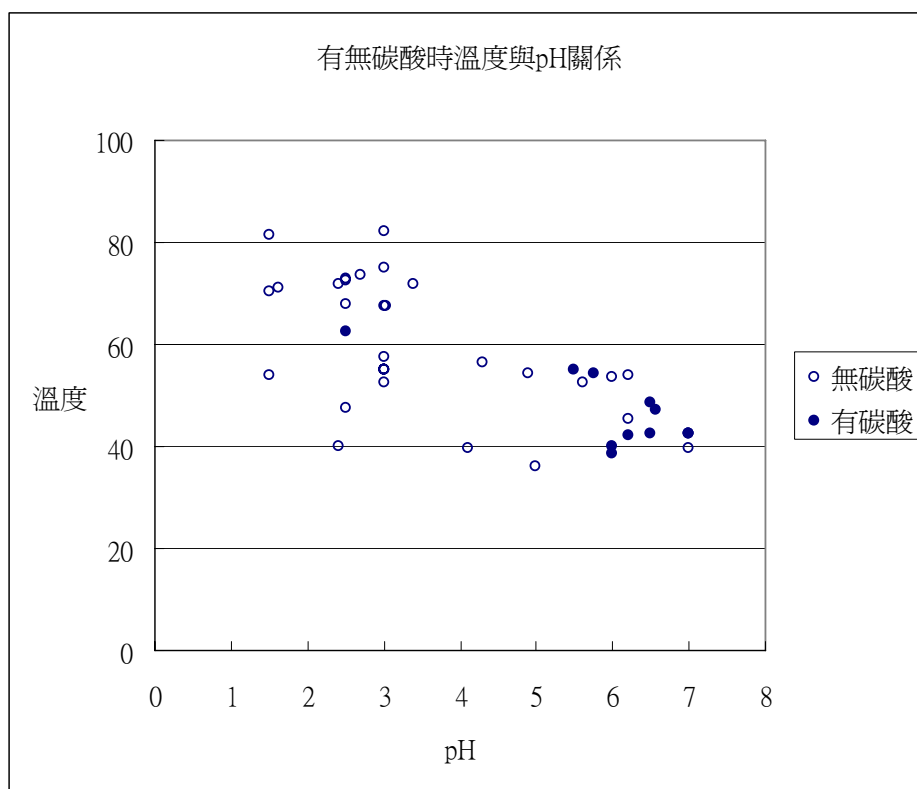


圖 3：陽明山國家公園區域溫泉碳酸根之有無與溫度和酸鹼度之關係

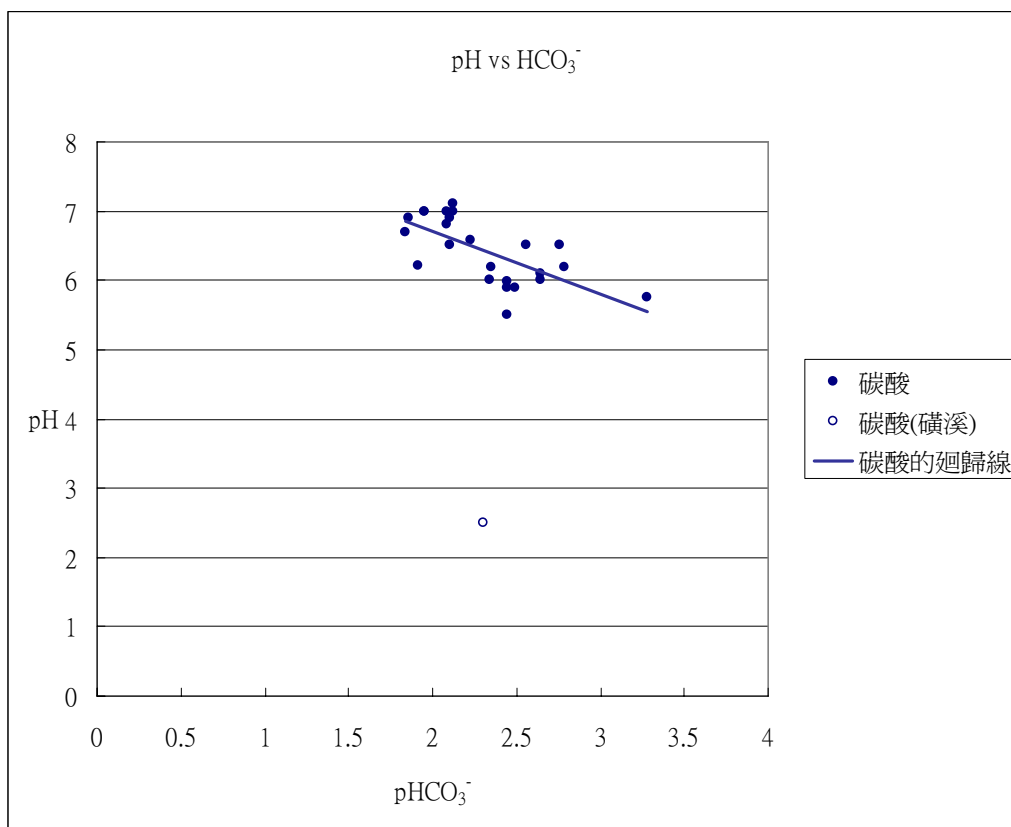


圖 4：陽明山國家公園區域含碳酸根溫泉之碳酸根含量與酸鹼度之關係

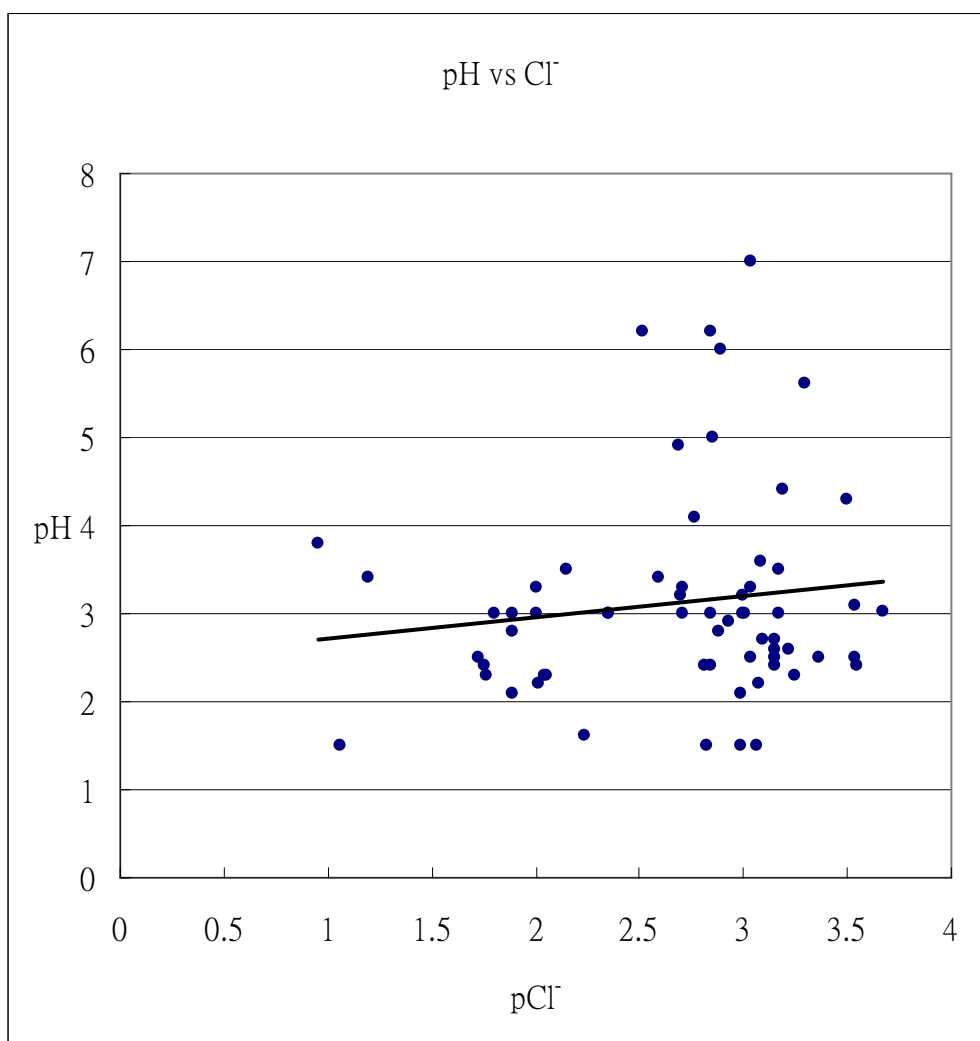


圖 5：陽明山國家公園區域不含碳酸根溫泉之氯離子含量與酸鹼度之關係

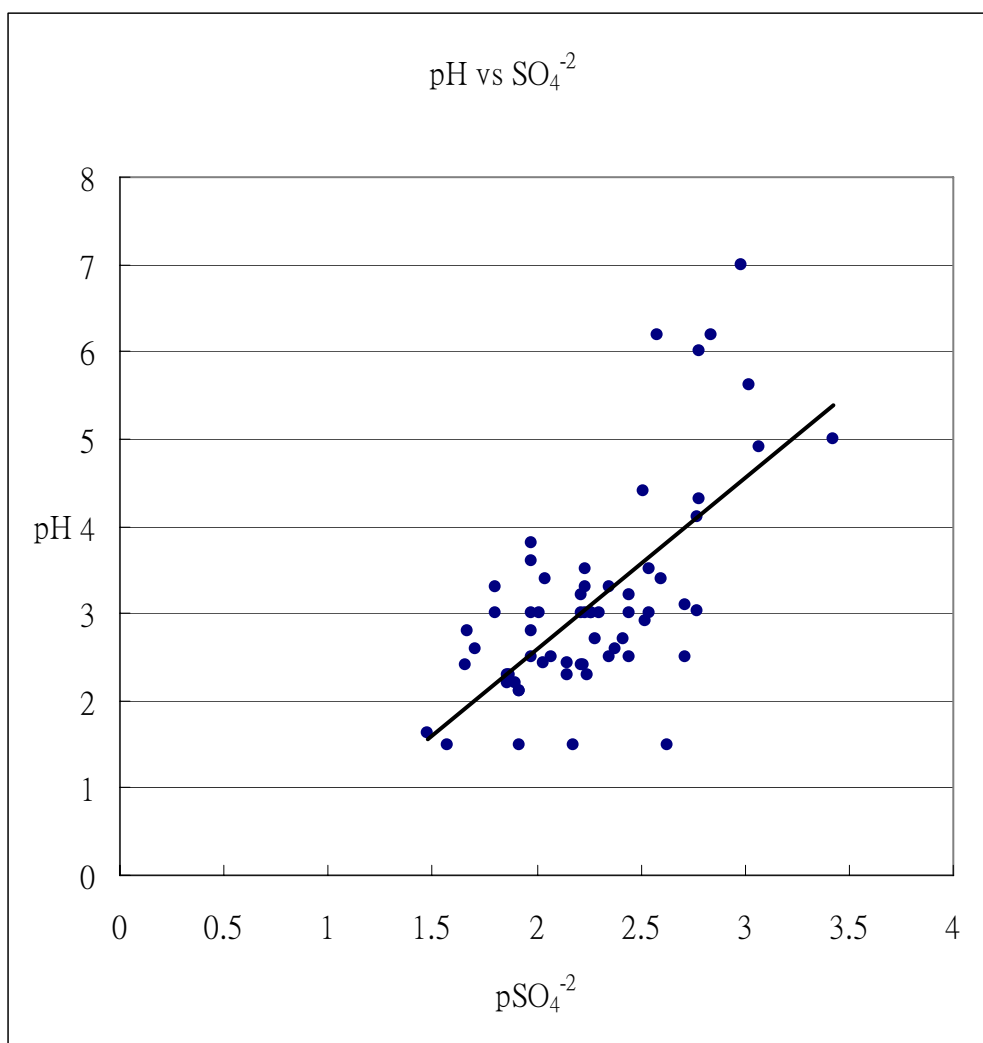


圖 6：陽明山國家公園區域不含碳酸根溫泉之硫酸根含量與酸鹼度之關係

整體而言，溫泉水可分為下列五大類：

(一) 酸性硫酸鹽氯化鈉泉，不含碳酸根且硫酸根及氯離子濃度高但鈉離子濃度高的酸性泉，如地熱谷、大埔和金山(表1)。

(二) 酸性硫酸鹽氯化物泉，不含碳酸根且硫酸根及氯離子濃度高但鈉離子濃度低的酸性泉，如小油坑、陽明路、七股、和翠林橋(表2)。

(三) 強酸性硫酸鹽泉，不含碳酸根、硫酸根濃度高於氯離子濃度且鈉離子濃度低的酸性泉，但硫酸根較濃且較酸者，如行義路、雙重溪、竹子湖、大油坑、八煙、和煨子坪(表3)。

(四) 低酸性硫酸鹽泉，不含碳酸根、硫酸根濃度高於氯離子濃度且鈉離子濃度低的酸性泉，但硫酸根較稀且較不酸者，如硫磺谷、龍鳳谷、雙重溪、小隱潭、陽明山、中山樓、馬槽和四磺坪(表4)。

(五) 中性至弱酸性碳酸鹽泉，含碳酸根但硫酸根、氯離子、鈉離子濃度皆低的中性泉，如頂北投、鼎筆橋、湖山、胡宗南墓、後山、冷水坑和下七股，馬槽也有此種泉(表5)。

另外，文獻中指出磺溪有一處含有碳酸根但為強酸性的溫泉，其硫酸根與氯離子濃度皆高(表6)。

第一類溫泉雖不在陽明山國家公園實質範圍內，但地熱谷泉水量大，堪為代表。第二類溫泉或為蒸汽型、或因已加蓋、或未尋得，本研究未採樣(表7)。第三類溫泉中的煨子坪較少人為干預，選為代表。第四類溫泉中選擇距離較遠、範圍較寬廣的硫磺谷(又名大磺嘴)、媽祖窟溪邊和四磺坪為代表。第五類溫泉俗稱鐵泉，是泡湯的好泉水，多已被民間將其源頭覆蓋，經過探勘選擇鼎筆橋及同屬頂北投溫泉系統的媽祖窟和羅漢窟浴池為代表。選擇的溫泉集中在南北兩側(圖7)。

表 1：酸性硫酸鹽酸氯化鈉泉的一般理化特性

溫泉	溫度(°C)	pH	SO ₄ ⁻²	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	Na ⁺
地熱谷		1.5	2566	3072	0	1003
地熱谷	69	1.7				
大埔		3.8	1015	3966	0	1497
金山		3.4	861	2251	0	1005

粗體字為本研究實測數據之平均值，細體字為參考陳耀麟(2002)及宋聖榮(2005)數據之平均值。

表 2：酸性硫酸鹽氯化物泉的一般理化特性

溫泉	溫度(°C)	pH	SO ₄ ⁻²	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	Na ⁺
小油坑	82	2.8	1015	462	0	97
陽明路	58	3.0	919	558	0	91
七股	42	2.4	893	625	0	32
翠林橋	48	2.5	1017	664	0	45

參考陳耀麟(2002)及宋聖榮(2005)數據之平均值。

表 3：強酸性硫酸鹽泉的一般理化特性

溫泉	溫度(°C)	pH	SO ₄ ⁻²	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	Na ⁺
行義路	71	1.5	635	31	0	9
雙重溪	-	2.6	1865	21	0	28
竹子湖	68	2.4	586	51	0	46
大油坑	73	1.6	3180	201	0	20
八煙	76	2.6	1360	51	0	78
煨子坪	54	2.1	1158	36	0	37
煨子坪大露頭	90	1.8				
煨子坪小露頭	73	1.7				
煨子坪人工池	48	3.1				

粗體字為本研究實測數據之平均值，細體字為參考陳耀麟(2002)及宋聖榮(2005)數據之平均值。

表 4：低酸性硫酸鹽泉的一般理化特性

溫泉	溫度(°C)	pH	SO ₄ ⁻²	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	Na ⁺
硫磺谷	74	3.2	550	24	0	12
硫磺谷大蓄水池	56	3.1				
硫磺谷水泥池	65	4.0				
龍鳳谷	68	3.3	427	33	0	18
媽祖窟溪邊	65	5.7				
雙重溪	54	6.0	158	45	0	22
小隱潭	53	3.3	561	69	0	35
陽明山	55	3.0	521	159	0	43
中山樓	55	3.5	278	24	0	13
馬槽	-	3.2	346	36	0	16
四磺坪	66	3.0	162	8	0	10
四磺坪水泥池	71	4.3				
四磺坪露頭	63	3.1				

粗體字為本研究實測數據之平均值，細體字為參考陳耀麟(2002)及宋聖榮(2005)數據之平均值。

表 5：中性至弱酸性碳酸鹽泉的一般理化特性

溫泉	溫度(°C)	pH	SO ₄ ⁻²	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	Na ⁺
頂北投	53	7.0	123	109	456	28
媽祖窟男湯	53	6.4				
羅漢窟女湯	51	7.1				
鼎筆橋	50	6.7	279	81	431	56
鼎筆橋	52	6.0				
湖山	48	6.6	118	112	712	20
胡宗南墓	43	6.5	66	12	168	35
後山	50	5.9	448	109	219	66
馬槽	51	5.8	162	9	32	16
冷水坑	41	6.0	217	91	179	32
下七股	49	6.5	1478	49	476	91

粗體字為本研究實測數據之平均值，細體字為參考陳耀麟(2002)及宋聖榮(2005)數據之平均值。

表 6：酸性硫酸鹽氯化物碳酸鹽泉的一般理化特性

溫泉	溫度(°C)	pH	SO ₄ ⁻²	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	Na ⁺
磺溪	63	2.5	974	329	301	40

參考陳耀麟(2002)及宋聖榮(2005)數據之平均值。

表 7：各溫泉位置和特性

溫泉	橫座標	縱座標	高程	出現形式	泉質	地理位置
地熱谷	300727	2781382	58	池中	酸性硫酸鹽 酸氯化鈉	北投中山路新 北投公園旁
硫磺谷	301965	2781992	138	蒸氣型，人工引 水加熱(池中)	酸性硫酸鹽	惇敘高工西南 300m 石壇路附 近谷地
龍鳳谷	302390	2782105	143	蒸氣型，地表水 滲入加熱(池中)	酸性硫酸鹽	惇敘高工東方 河谷內
行義路	302552	2781685	115		酸性硫酸鹽	北投區行義路 左側，磺溪東側 山坡
雙重溪	302572	2782050	168	蒸氣型，人工引 水加熱(池中)	酸性硫酸鹽	惇敘高工東方 谷地
頂北投	302730	2782285	195	露頭多	中性至弱酸 性硫酸鹽碳 酸鹽	北投區泉源里 及湖山里，雙重 溪北面，南磺溪 上游山谷內
鼎筆橋	303174	2783352	310	岩壁滲出	中性至弱酸 性硫酸鹽碳 酸鹽	紗帽山西側，泉 源路鼎筆橋東 北方 500 m， 南磺溪上游支 流河谷旁
湖山	303180	2782700	290	無自然湧出露頭 (池中)	中性至弱酸 性硫酸鹽碳 酸鹽	湖山國小旁，南 磺溪上游支流 山谷內
小隱潭	303490	2783395	362	岩壁滲出	酸性硫酸鹽	陽明山公園小 隱潭下方谷地

表 7：各溫泉位置和特性（續一）

溫泉	橫座標	縱座標	高程	出現形式	泉質	地理位置
陽明山	303785	2783880	490	3 個泉源順溪谷分布，附近有黏土	酸性硫酸鹽	南磺溪上游谷地，竹子湖氣象觀測站西南 200 m 的溪谷瀑布下方
胡宗南墓	303915	2784370	607	蒸氣型，混有地表水	中性至弱酸性硫酸鹽碳酸鹽	胡宗南墓旁的山溝中
竹子湖	304136	2784295	621	蒸氣型，大雨過後才有足量水湧出(池中)	酸性硫酸鹽	七星山南坡，中興路與陽金公路交會點之東北方
小油坑	304382	2785500	800	蒸氣型，大雨過後才有足量水湧出	酸性硫酸鹽氯化物	七星山西北坡上
陽明路	304530	2782492	388	露頭以加蓋	酸性硫酸鹽氯化物	紗帽山東邊溪溝中
中山樓	304620	2783750	433	蒸氣型(池中)	酸性硫酸鹽	位於中山樓內
後山	304924	2786458	556	併有冷熱硫磺泉質露頭	中性至弱酸性硫酸鹽碳酸鹽	北磺溪上源鹿角坑溪溪谷中
馬槽	305850	2785680	520	蒸氣型，混有地表水，沿石壁滲出	酸性硫酸鹽 / 中性至弱酸性硫酸鹽碳酸鹽	陽金公路馬槽橋邊的斷崖下方
冷水坑	305882	2784695	745	岩壁滲出，2 種不同泉質	中性至弱酸性硫酸鹽碳酸鹽	七星山、七股山與痲瘋山間的東側谷地，七星山夢幻湖東方 300m
七股	306125	2785912	500	自地下湧流出(池中)	酸性硫酸鹽氯化物	陽金公路馬槽橋下方馬槽溪溪谷中

表 7：各溫泉位置和特性（續二）

溫泉	橫座標	縱座標	高程	出現形式	泉質	地理位置
翠林橋	306390	2786380	476	併有冷熱硫磺泉質露頭	酸性硫酸鹽氯化物	陽金公路馬槽橋下游馬槽溪翠林橋旁
磺溪	307346	2785398	423	蒸氣型，混有地表水，沿石壁滲出	酸性硫酸鹽氯化物	大油坑溫泉下方磺溪河谷中
大油坑	307621	2785180	448	強烈熱氣活動，多處熱水瀑布	酸性硫酸鹽	陽金公路磺溪橋上游 400m 的磺溪谷中
下七股	307690	2786284	362	併有冷熱硫磺泉質露頭	中性至弱酸性硫酸鹽碳酸鹽	下七股山東側山溝
八煙	308502	2787543	241	噴氣孔、泥塘、熱水上湧	酸性硫酸鹽	陽金公路天籟溫泉館與磺溪頭之間
四磺坪	309995	2787765	366	噴氣孔、泥塘、熱水上湧	酸性硫酸鹽	磺嘴山山腰，台北華城東南方 500m，距陽金公路 2.1km
煨子坪	310985	2786848	462	許多噴氣孔等溫泉徵兆	酸性硫酸鹽	磺嘴山東北側山腳下，清水溪上源處，距陽金公路 4 km

參考文獻：宋聖榮(2005)

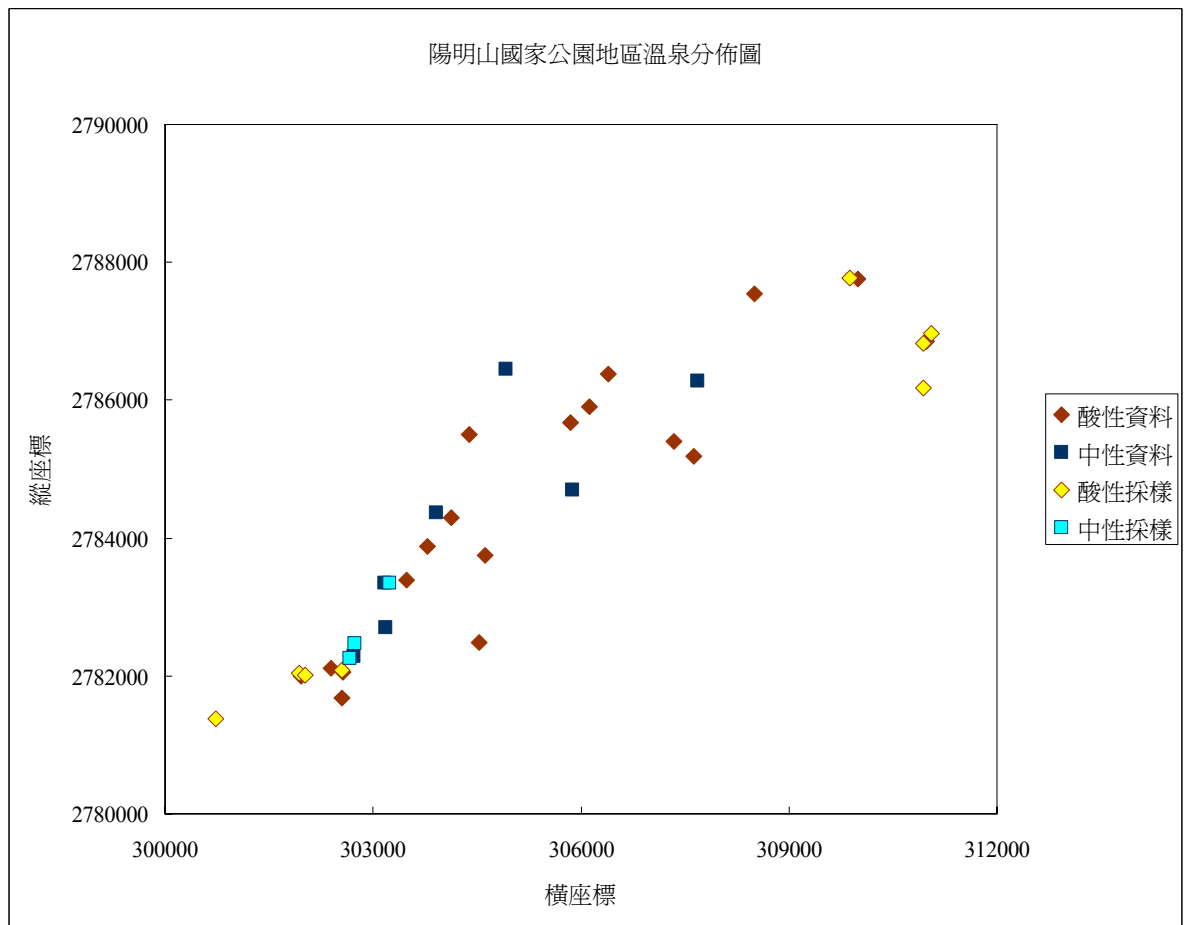


圖 7：本研究在陽明山國家公園區域的溫泉採樣分佈

第二節 培養實驗

地熱谷溫泉酸性強 (pH1.47)，接種於 pH5 之培養基仍呈酸性 (pH2.5~3)，經過主培養和次培養後只有在含 peptone 和 yeast extract 的條件下有明顯生長，其 pH 值接近中性 (pH6~7) (表 8)。

表 8：地熱谷溫泉在不同培養基中富積培養之結果

樣本	主培養		接種到主培養基後之 pH	次培養	
	培養基	pH		OD ₆₆₀ (7)	pH ₍₇₎
地熱谷 pH1.47	YP	5.0	2.50	<u>0.332</u>	6.94
		2.5	2.28	<u>0.115</u>	5.99
	G	5.0	2.30	<u>0.059</u>	2.86
		2.5	2.17	0.034	2.61
	S	5.0	2.31	0.002	3.15
		2.5	2.29	0.008	2.44
	X	5.0	2.29	0.033	3.02
		2.5	2.13	0.020	2.34

煖子坪溫泉中酸性泉水 (pH1.68, 1.76) 富積培養之結果與地熱谷溫泉相同，只有在含 peptone 和 yeast extract 的條件下有明顯生長；但酸性較弱 (pH3.11) 富積培養後不僅在含 peptone 和 yeast extract 的條件下有明顯生長，在不含有機氮源而以 glucose、sucrose、xylose 為唯一碳源的條件下也有明顯生長 (表 9)。

酸性較弱的四磺坪溫泉 (pH3.28, 3.73) 和硫磺谷溫泉 (pH3.11, 4.00)，與煖子坪溫泉中酸性較弱泉水之富積培養結果相似，在不含有機氮源的條件下也能有明顯生長。(表 10, 11)

媽祖窟溪邊噴汽口引溪水加熱酸性更弱 (pH5.70)，富積培養結果與前述酸性較弱泉水相似，在不含有機氮源的條件下也能有明顯生長。(表 12)

中性含碳酸的媽祖窟浴池 (pH6.12-6.70)、鼎筆橋溫泉 (pH5.95) 和羅漢窟浴池 (pH7.12)，經過主培養和次培養後只有在 pH5 和 pH7 的條件下有明顯生長 (表 13 - 15)。羅漢窟浴池溫泉中的微生物似乎只能在含 peptone 和 yeast extract 的條件下才有明顯生長 (表 14)。

表 9：煖子坪溫泉在不同培養基中富積培養之結果

樣本	主培養		接種到主培養基後之 pH	次培養	
	培養基	pH		OD ₆₆₀ (7)	pH ₍₇₎
煖子坪 大露頭 pH 1.76	YP	5.0	2.56	<u>0.122</u>	4.23
		2.5	2.34	0.004	2.52
	G	5.0	2.35	0.014	3.03
		2.5	2.23	0.001	2.47
	S	5.0	2.37	0.011	3.08
		2.5	2.25	0.007	2.41
	X	5.0	2.43	0.004	3.06
		2.5	2.29	0.004	2.32
煖子坪 小露頭 pH 1.68	YP	5.0	2.54	<u>0.314</u>	5.67
		2.5	2.33	<u>0.060</u>	2.52
	G	5.0	2.30	0.011	2.70
		2.5	2.16	0.005	2.42
	S	5.0	2.38	0.017	2.72
		2.5	2.25	0.004	2.32
	X	5.0	2.34	0.009	2.71
		2.5	2.26	0.008	2.26
煖子坪 人工池 pH 3.11	YP	5.0	3.82	<u>0.254</u>	7.15
		2.5	2.90	<u>0.125</u>	5.65
	G	5.0	3.17	0.042	2.91
		2.5	2.83	<u>0.067</u>	2.57
	S	5.0	3.17	0.049	2.75
		2.5	2.88	<u>0.060</u>	2.35
	X	5.0	3.13	-	-
		2.5	2.82	<u>0.093</u>	2.27

表 10：四磺坪溫泉在不同培養基中富積培養之結果

樣本	主培養		接種到主培養基後之 pH	次培養	
	培養基	pH		OD _{660 (7)}	pH ₍₇₎
四磺坪 水泥池 pH 3.73	YP	5.0	4.70	<u>0.189</u>	5.20
		2.5	3.08	0.043	2.61
	G	5.0	4.01	<u>0.071</u>	2.88
		2.5	3.06	<u>0.077</u>	2.39
	S	5.0	4.00	<u>0.156</u>	2.70
		2.5	3.11	0.028	2.48
	X	5.0	3.42	0.008	3.30
		2.5	3.12	0.006	2.68
四磺坪 露頭 pH 3.28	YP	5.0	3.70	<u>0.363</u>	6.91
		2.5	3.01	<u>0.141</u>	3.22
	G	5.0	3.25	<u>0.253</u>	2.44
		2.5	2.90	<u>0.156</u>	2.38
	S	5.0	3.31	<u>0.057</u>	2.96
		2.5	3.02	<u>0.144</u>	2.31
	X	5.0	3.26	<u>0.145</u>	2.59
		2.5	3.07	0.045	2.33

表 11：硫磺谷溫泉在不同培養基中富積培養之結果

樣本	主培養		接種到主培養基後之 pH	次培養	
	培養基	pH		OD _{660 (7)}	pH ₍₇₎
硫磺谷 大蓄水池 pH 3.11	YP	5.0	4.23	<u>0.295</u>	6.95
		2.5	3.00	<u>0.273</u>	6.77
	G	5.0	5.55	<u>0.193</u>	3.27
		2.5	3.07	<u>0.137</u>	2.71
	S	5.0	5.36	<u>0.115</u>	3.13
		2.5	3.22	<u>0.101</u>	2.83
	X	5.0	5.65	<u>0.060</u>	5.72
		2.5	3.24	<u>0.167</u>	2.77
硫磺谷 水泥池 pH 4.00	YP	5.0	4.70	<u>0.431</u>	7.58
		2.5	3.06	<u>0.312</u>	7.11
	G	5.0	6.24	<u>0.053</u>	6.24
		2.5	3.21	<u>0.082</u>	2.95
	S	5.0	6.12	<u>0.055</u>	6.24
		2.5	3.44	<u>0.088</u>	2.95
	X	5.0	6.22	<u>0.056</u>	5.80
		2.5	3.48	<u>0.192</u>	2.94

表 12：媽祖窟溪邊池溫泉在不同培養基中富積培養之結果

樣本	主培養		接種到主培養基後之 pH	次培養	
	培養基	pH		OD _{660 (7)}	pH ₍₇₎
媽祖窟 溪邊池 pH 5.70	YP	5.0	5.50	<u>0.544</u>	7.97
		2.5	2.72	<u>0.088</u>	5.96
	G	5.0	5.61	<u>0.101</u>	2.86
		2.5	2.80	<u>0.088</u>	2.41
	S	5.0	5.60	-	-
		2.5	2.75	0.033	2.31
	X	5.0	5.63	0.045	2.82
		2.5	2.60	<u>0.135</u>	2.25

表 13：媽祖窟浴池溫泉在不同培養基中富積培養之結果

樣本	主培養		接種到主培養基後之 pH	次培養	
	培養基	pH		OD _{660 (7)}	pH ₍₇₎
媽祖窟 男湯 pH 6.12	YP	7.0	6.59	<u>0.377</u>	7.41
		5.0	6.09	<u>0.468</u>	8.09
		2.5	3.37	0.000	2.72
	G	7.0	6.85	<u>0.373</u>	4.05
		5.0	6.73	<u>0.402</u>	4.19
		2.5	6.02	0.000	2.67
	S	7.0	6.84	<u>0.295</u>	4.38
		5.0	6.74	<u>0.228</u>	4.78
		2.5	4.03	0.001	2.64
	X	7.0	6.87	<u>0.063</u>	6.35
		5.0	6.68	0.046	6.32
		2.5	3.11	0.001	2.41

表 14：羅漢窟浴池溫泉在不同培養基中富積培養之結果

樣本	主培養		接種到主培養基後之 pH	次培養	
	培養基	pH		OD _{660 (7)}	pH ₍₇₎
羅漢窟 女湯 pH 7.12	YP	7.0	6.75	<u>0.182</u>	7.29
		5.0	6.47	<u>0.267</u>	7.00
		2.5	3.41	0.000	2.96
	G	7.0	6.73	0.000	6.89
		5.0	6.57	0.000	6.89
		2.5	6.12	0.000	2.65
	S	7.0	6.71	0.019	6.60
		5.0	6.75	0.007	5.87
		2.5	4.34	0.000	2.54
	X	7.0	6.71	0.002	6.17
		5.0	6.58	0.000	6.31
		2.5	3.17	0.000	2.43

表 15：鼎筆橋溫泉在不同培養基中富積培養之結果

樣本	主培養		接種到主培養基後之 pH	次培養	
	培養基	pH		OD _{660 (7)}	pH ₍₇₎
鼎筆橋 pH 5.95	YP	7.0	6.10	<u>0.332</u>	7.76
		5.0	5.52	<u>0.287</u>	7.85
	G	7.0	6.83	<u>0.155</u>	4.93
		5.0	6.68	<u>0.190</u>	5.00
	S	7.0	6.80	<u>0.144</u>	4.02
		5.0	6.70	<u>0.228</u>	4.30
	X	7.0	6.77	<u>0.151</u>	6.00
		5.0	6.63	<u>0.189</u>	5.25

陽明山國家公園區域內溫泉的 pH 值變化很大，從約 1.5 到 7.0；使用 pH5.0 的培養基進行富積培養，接種後培養基 pH 值會隨溫泉 pH 值而變化，皆能使溫泉內的微生物生長（表 16）。

表 16：比較各溫泉在不同培養基中富積培養之結果

樣本	樣本 pH	樣本溫度(°C)	接種到培養基後之 pH	不同培養基富積培養後於次培養中的細胞增生 (OD ₆₆₀₍₇₎)			
				YP	G	S	X
地熱谷	1.5	70	2.3-2.5	0.332	0.059	0.002	0.033
煨子坪大露頭	1.8	90	2.4-2.6	0.122	0.014	0.011	0.004
煨子坪小露頭	1.7	65	2.3-2.5	0.314	0.011	0.017	0.009
煨子坪人工池	3.1	48	3.1-3.8	0.254	0.042	0.049	-
四礮坪露頭	3.3	63	3.3-3.7	0.363	0.253	0.057	0.145
四礮坪水泥池	3.7	71	3.4-4.7	0.189	0.071	0.156	0.008
硫磺谷大蓄水池	3.1	56	4.2-5.7	0.295	0.193	0.115	0.060
硫磺谷水泥池	4.0	65	4.7-6.2	0.431	0.053	0.055	0.056
媽祖窟溪邊池	5.7	65	5.5-5.6	0.544	0.101	-	0.45
媽祖窟男湯	6.1	53	6.0-6.7	0.468	0.402	0.228	0.046
羅漢窟女湯	7.1	51	6.5-6.8	0.150	-	-	0.011
鼎筆橋	6.0	52	5.5-6.7	0.287	0.190	0.228	0.189

主培養及次培養皆在 pH5.0 的培養基中於 70°C 進行。

第三節 應用潛力研究

針對十二個溫泉樣品，在 pH5.0 含有 peptone 和 yeast extract 的條件下富積培養後的樣品萃取其中甲醇或乙酸乙酯可溶物，進行抗微生物實驗，發現在測試濃度之下對於格藍氏陰性細菌 *Escherichia coli*、格藍氏陽性細菌 *Staphylococcus aureus*、和酵母菌 *Candida albicans* 皆無抑制活性。

由培養實驗發現多數溫泉皆有能利用 glucose 或 xylose 的微生物，顯示有可能存在能分解 starch、cellulose 或 xylan 的微生物。參考表 16 的結果，挑選地熱谷、硫磺谷和媽祖窟等三處溫泉進行微生物分解能力測試。在僅添加少量 (0.1g/L) 的 Peptone 和 Yeast extract 的基礎培養基(pH5.0)中分別添加 1g/L 的 starch、xylan、cellulose、chitin、nonylphenol 和 phenanthrene，於 70°C 振盪培養 10 天，然後用含 1g/L 的 Peptone 和 Yeast extract 的生長培養基測試其中活的微生物含量是否較對照組為高。若實驗組接種到生長培養基後有較高的微生物生長現象 (OD 值較高)，則表示原先富積培養時有微生物能夠分解測試探源。結果發現地熱谷溫泉最具開發潛力，除了有分解 starch、cellulose、chitin 的微生物外，對於 phenanthrene 也可能具有分解潛力 (表 17)。硫磺谷溫泉可能有分解纖維素的嗜酸嗜熱菌 (表 18)，而媽祖窟溫泉可能有分解澱粉的中性嗜熱菌 (表 19)。

表 17：地熱谷溫泉中具有分解能力微生物之富積培養結果

培養基	測試碳源	OD ₆₆₀ (0)	OD ₆₆₀ (2)	OD ₆₆₀ (3)	OD ₆₆₀ (4)	具有分解微生物
無機鹽		0.095	0.219	0.262	0.219	
基礎培養基		0.087	0.206	0.223	0.152	
	Starch	0.146	0.290	0.358	0.301	+
	Xylan	0.155	0.194	0.208	0.241	
	Cellulose	0.316	0.461	0.428	0.435	+
	Chitin	0.264	0.426	0.520	0.451	+
	Nonylphenol	0.127	0.106	0.116	0.045	
	Phenanthrene	0.257	0.199	0.288	0.258	?

基礎培養基(pH5.0)為無機鹽培養基添加 0.1g/L的Peptone和Yeast extract，然後再分別添加 1g/L的測試碳源。取 5mL溫泉樣本（含底泥）加到含有 50mL培養基的 250mL錐形瓶中，於 70°C振盪培養 10 天，靜置 10 分鐘後，取 1 毫升上層液，接到含 15 毫升生長培養基（含 1g/L的Peptone和Yeast extract）的 50 毫升有蓋離心管中，於 70°C振盪培養。並測量OD₆₆₀。

表 18：硫磺谷水泥池溫泉中具有分解能力微生物之富積培養結果

培養基	測試碳源	OD ₆₆₀ (0)	OD ₆₆₀ (2)	OD ₆₆₀ (3)	OD ₆₆₀ (4)	具有分解微生物
無機鹽		0.051	0.040	0.046	0.007	
基礎培養基		0.050	0.082	0.086	0.050	
	Starch	0.047	0.048	0.052	0.010	
	Xylan	0.057	0.059	0.056	0.021	
	Cellulose	0.058	0.140	0.209	0.311	+
	Chitin	0.052	0.045	0.049	0.003	
	Nonylphenol	0.084	0.082	0.093	0.053	
	Phenanthrene	0.045	0.045	0.051	0.005	

表 19：媽祖窟浴池男湯中具有分解能力微生物之富積培養結果

培養基	測試碳源	OD ₆₆₀ (0)	OD ₆₆₀ (2)	OD ₆₆₀ (3)	OD ₆₆₀ (4)	具有分解 微生物
無機鹽		0.040	0.039	0.045	0.199	
基礎培養基		0.085	0.055	0.057	0.011	
	Starch	0.067	0.541	0.525	0.455	+
	Xylan	0.049	0.054	0.058	0.015	
	Cellulose	0.051	0.076	0.058	0.009	
	Chitin	0.047	0.042	0.045	0.005	
	Nonylphenol	0.045	0.042	0.044	0.005	
	Phenanthrene	0.042	0.044	0.045	0.006	

第四節 確立分子生物學方法操作條件

比較不同市售土壤中DNA萃取套組之效果，發現PowerSoil™ DNA isolation kit效果較佳（圖 8）。測試不同Bacterial primers對於放大樣品DNA中 16S rRNA基因片段的效果，結果發現 27 f + 1492 r 的結果最好。（圖 9, 10）而Arch21F + Arch958R對於樣品DNA中古菌的 16S rRNA基因片段有很好的放大結果。（圖 11）隨後，為了確保PCR產物尾端有 3'-A以增加 T-A 選殖效率，設計 bacterial primers: 27f-1512R及archaeal primers: 26f-973R，發現可得到較佳結果（表 20）。

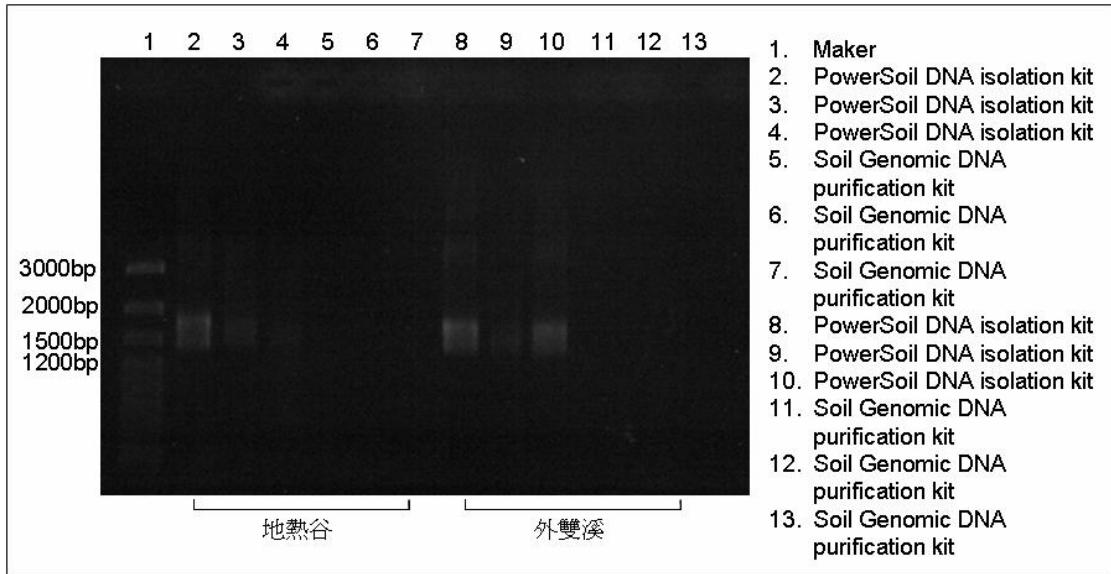


圖 8：比較不同市售土壤中 DNA 萃取套組的效果。Primers: 8F & 1510R

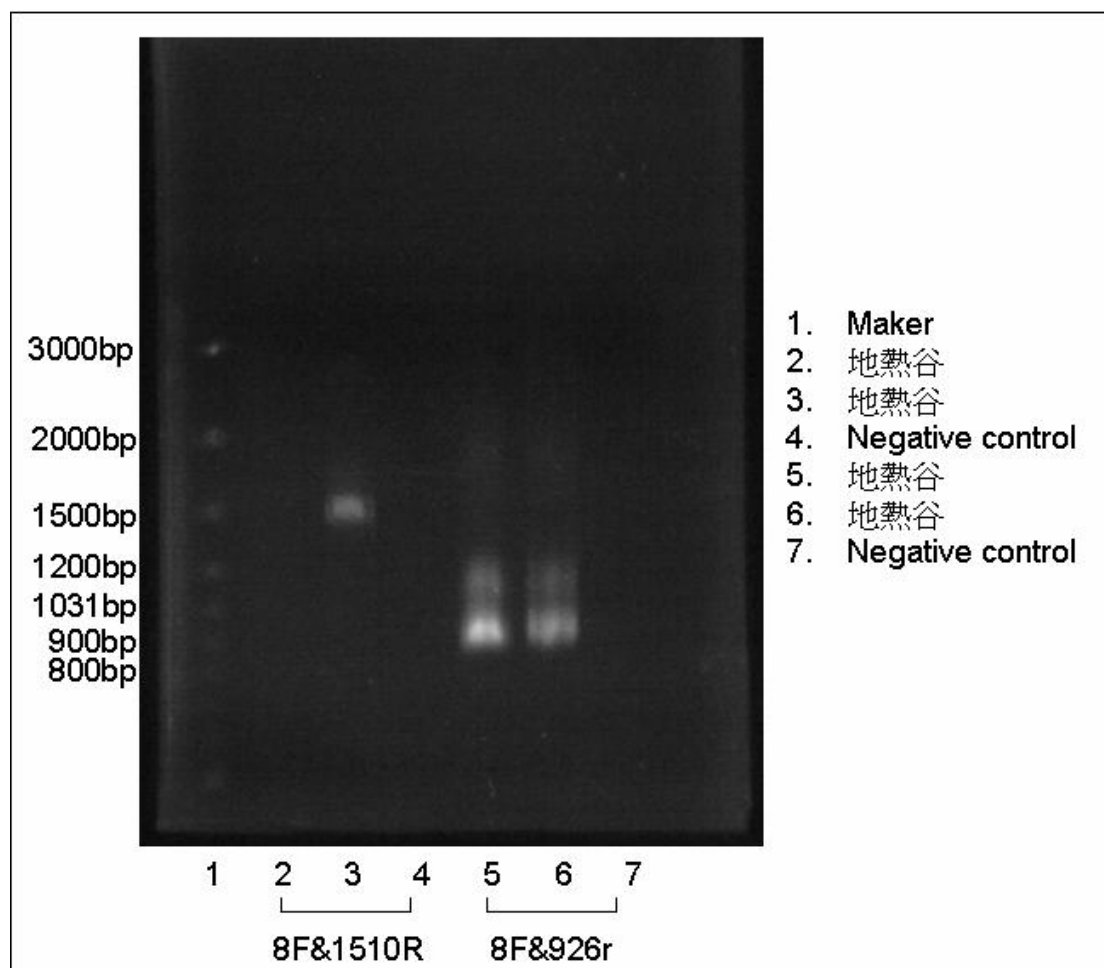
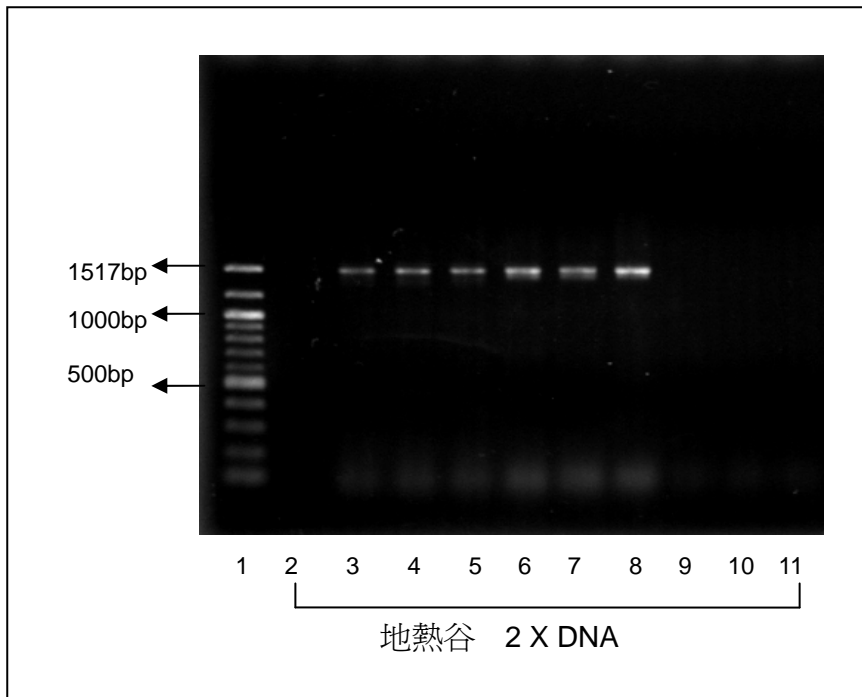
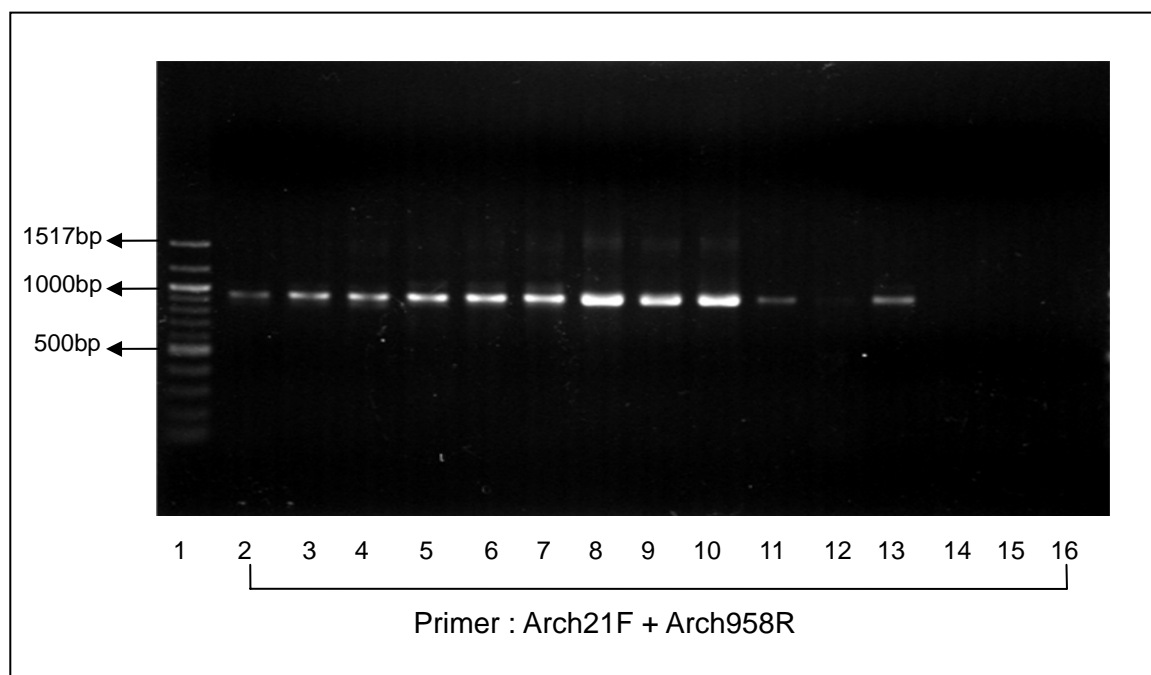


圖 9：測試不同 Bacterial primers 對於放大樣品 DNA 中 16S rRNA 基因片段的
效果（一）



- 1 Maker
- 2 地熱谷 DNA 5 μ L
- 3 4 5 primer : 8F + 1510 R
- 6 7 8 primer : 27 f + 1492 r
- 9 10 11 primer : Arch21F + 1492 r

圖 10：測試不同 Bacterial primers 對於放大樣品 DNA 中 16S rRNA 基因片段的效果（二）



1	Maker									8 9 10	煥子坪人工水池	DNA
2 3 4	四磺坪水泥池	DNA								11 12 13	煥子坪大露頭	DNA
5 6 7	四磺坪露頭	DNA								14 15 16	煥子坪小露頭	DNA

圖 11：測試 Archerial primers 對於放大樣品 DNA 中 16S rRNA 基因片段的効果

表 20：不同 primer 所得 PCR 產物對轉型效率的影響

Primers ^a	transformation efficiency (cfu / μg DNA)	
	Ligation product of bacterial 16S DNA ^b	Ligation product of archaeal 16S DNA ^b
27f, 1492r	1.4×10^2	
27f, 1512R	6.5×10^2	
Arch21F, Arch958R		2.5×10^2
Arch26f, Arch973R		3.6×10^2

^a27f: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG, 1492r: 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT, 1492R': 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT, Arch21F: 5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA, Arch26f: 5'-GGTTGATCCYGCCGGA, Arch958R: YCCGGCGTTGAMTCCAATT, Arch973R: 5'-GGCGTTGAMTCCAATT
^b pGEM-T Easy Vector and PCR product of sample 3

經過 PCR 反應得到的 DNA 片段必須具有尾端突出的腺核苷 (A-tailing) 才能進行 TA 接合。一般來說，將 PCR 反應得到的 DNA 片段經過純化再進行下一步的反應可以避免雜質干擾，但有時純化步驟可能破壞尾端突出的腺核苷，導致無法進行 TA 接合。實驗結果發現，不經過純化步驟直接使用 PCR 產物效果較佳（表 21）。

表 21：純化 PCR 產物對轉型效率的影響

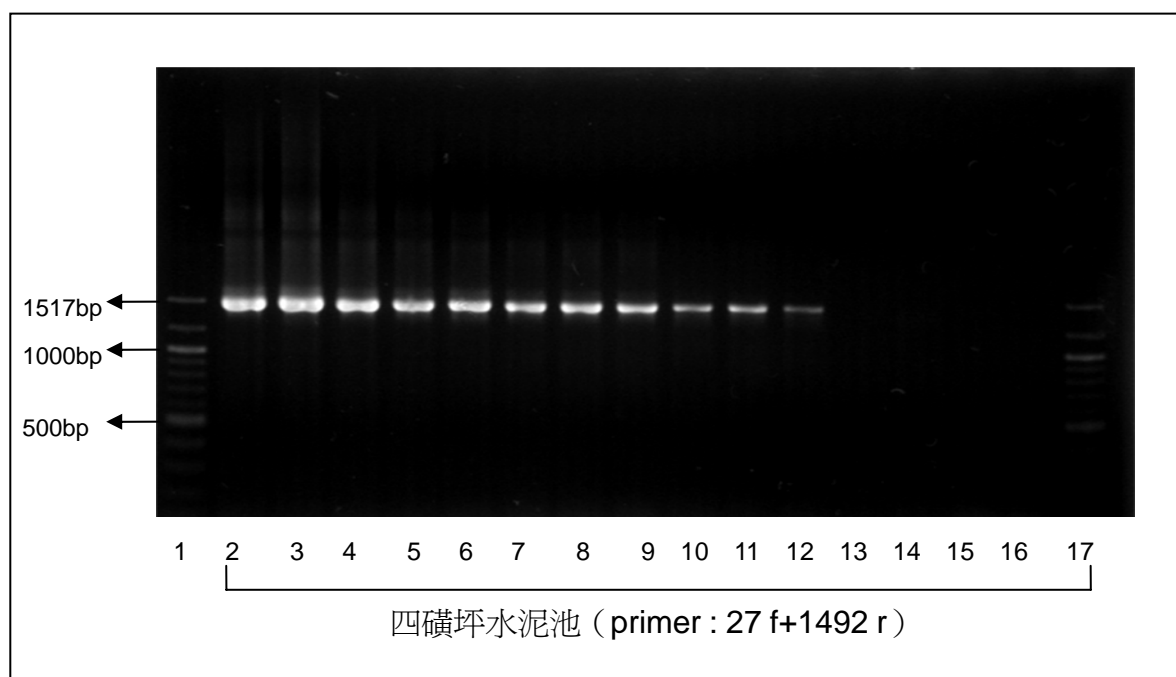
PCR product ^a	transformation efficiency ^b (cfu / μg DNA)
Purified	9×10
Non-purified	4.9×10^2

^a Purified (Geneaid elution kit) or non-purified PCR products of sample 3 using bacterial primers (27f and 1492r) were ligated with pGEM-T Easy Vector

^b Commercial competent cell of *E. coli* JM109 purchased from Genomics BioSci & Tech was used

第五節 溫泉中古菌與細菌之初步定量

由不同溫泉樣品 DNA 中細菌與古菌 16S rRNA 基因片段的放大結果 (圖 12) 可知不同溫泉中的細菌和古菌相對含量並不相同。此外也發現利用 PCR 可以進行溫泉樣品 DNA 中 16S rRNA 基因片段的定量 (圖 13, 14)。取 1 倍體積經過一系列 2 倍稀釋的 DNA 樣品或取 2 倍、4 倍體積的 DNA 樣品進行 PCR，然後取定量進行電泳分析，觀察被放大的 DNA 量，以估算溫泉樣品中古菌與細菌的相對量。結果得知強酸性溫泉如地熱谷和煥子坪露頭中的微生物含量非常低，但細菌的相對量似乎略多。弱酸性溫泉如煥子坪人工池、四磺坪和硫磺谷中的微生物含量相當多且似乎古菌較多。接近中性的溫泉如媽祖窟溪邊溫泉和鼎筆橋溫泉則以細菌較多 (表 22)。



- | | |
|----------|--------------|
| 1 | Maker |
| 2 3 | 1 X DNA |
| 4 5 6 | 1/4 X DNA |
| 7 8 9 | 1/16 X DNA |
| 10 11 12 | 1/64 X DNA |
| 13 14 | 1/256 X DNA |
| 15 16 | 1/1024 X DNA |

圖 13：利用 PCR 進行溫泉樣品 DNA 中 16S rRNA 基因片段的定量結果（一）

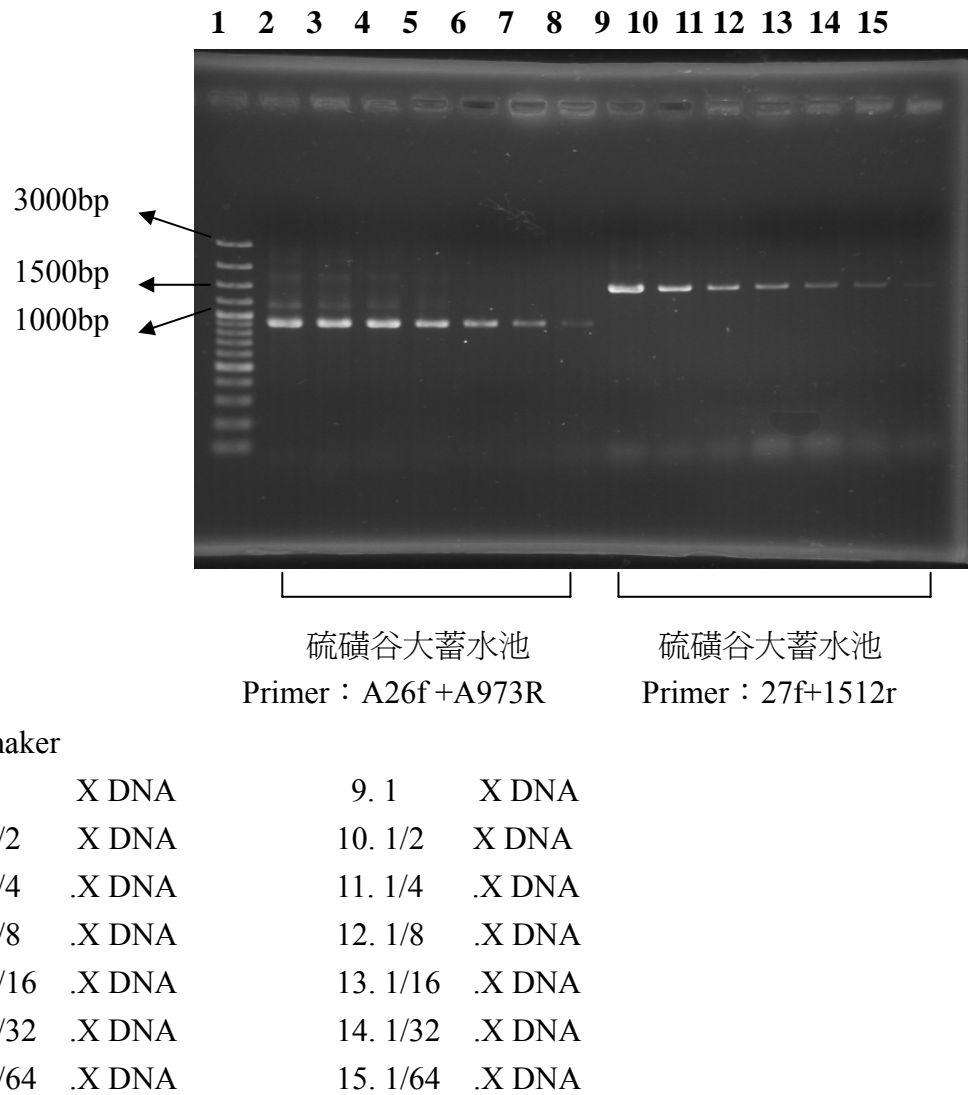


圖 14：利用 PCR 進行溫泉樣品 DNA 中 16S rRNA 基因片段的定量結果（二）

表 22：各溫泉樣本中古菌與細菌之初步定量

樣本	樣本 pH	樣本溫度(°C)	Archaeal titer	Bacterial titer	A / B
地熱谷	1.5	70	$<2^{-3}$	2^0	$<2^{-3}$
煥子坪大露頭	1.8	90	$<2^{-3}$	2^{-1}	$<2^{-2}$
煥子坪小露頭	1.7	65	$<2^{-3}$	2^{-1}	$<2^{-2}$
煥子坪人工池	3.1	48	2^{10}	2^8	2^2
四磺坪露頭	3.3	63	2^7	2^1	2^6
四磺坪水泥池	3.7	71	2^4	2^1	2^3
硫磺谷大蓄水池	3.1	56	2^6	2^5	2^1
硫磺谷水泥池	4.0	65	2^2	2^2	2^0
媽祖窟溪邊池	5.7	65	2^9	2^{12}	2^{-3}
鼎筆橋	6.0	52	2^0	2^6	2^{-6}

第六節 溫泉中古菌與細菌之多樣性

挑選煖子坪人工池、煖子坪大露頭、硫磺谷水泥池、地熱谷等四處溫泉進行微生物 16S rRNA 基因片段選殖與 RFLP 分析。每個樣品隨機挑選約 25 個有效選殖株，將 M13 primers 放大的 16S rRNA 基因片段分別用 Rsa I、Sau3A I、Hha I 進行分解，然後以 1.6% 洋菜凝膠進行電泳分析，以肉眼觀察將不同片段長度多型性予以分類（圖 15-20）。然後計算生物多樣性指數。結果發現煖子坪人工池中的古菌多樣性最大（表 23），此結果與其中古菌量最多（表 22）相吻合。煖子坪人工池與煖子坪大露頭空間距離最近但其中古菌多樣性的相似度最低，煖子坪人工池與硫磺谷水泥池空間距離雖遠但其中古菌多樣性的相似度反而最高。由於後二者皆為弱酸性溫泉，而煖子坪大露頭為強酸性溫泉，顯然化學環境的影響較大。比較煖子坪人工池、煖子坪大露頭、硫磺谷水泥池和地熱谷溫泉，發現硫磺谷水泥池中細菌的多樣性最大，煖子坪人工池與煖子坪大露頭、地熱谷的細菌相完全不同（表 24）。

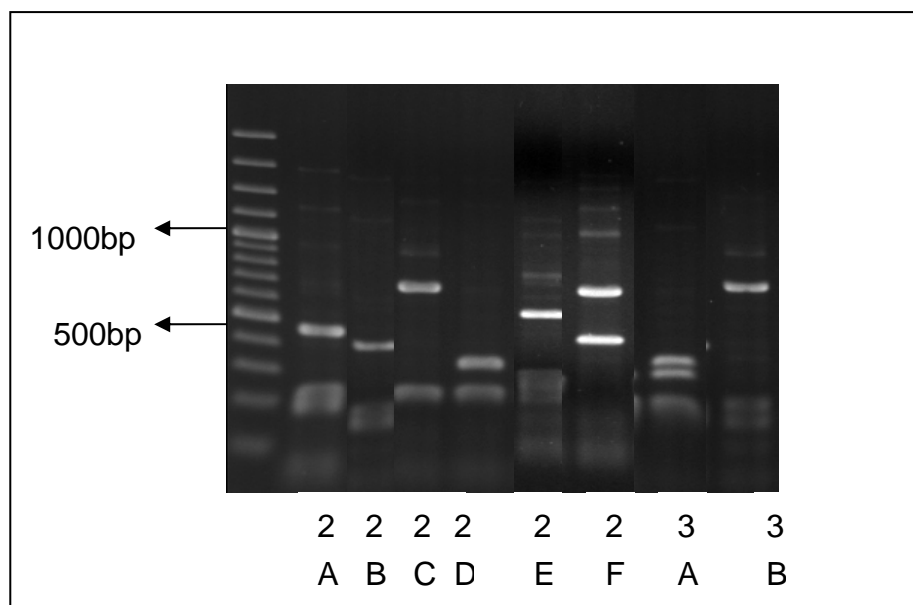


圖 15：古菌的 16S rRNA 基因片段用 *Rsa* I 切割的 RFLP 類型

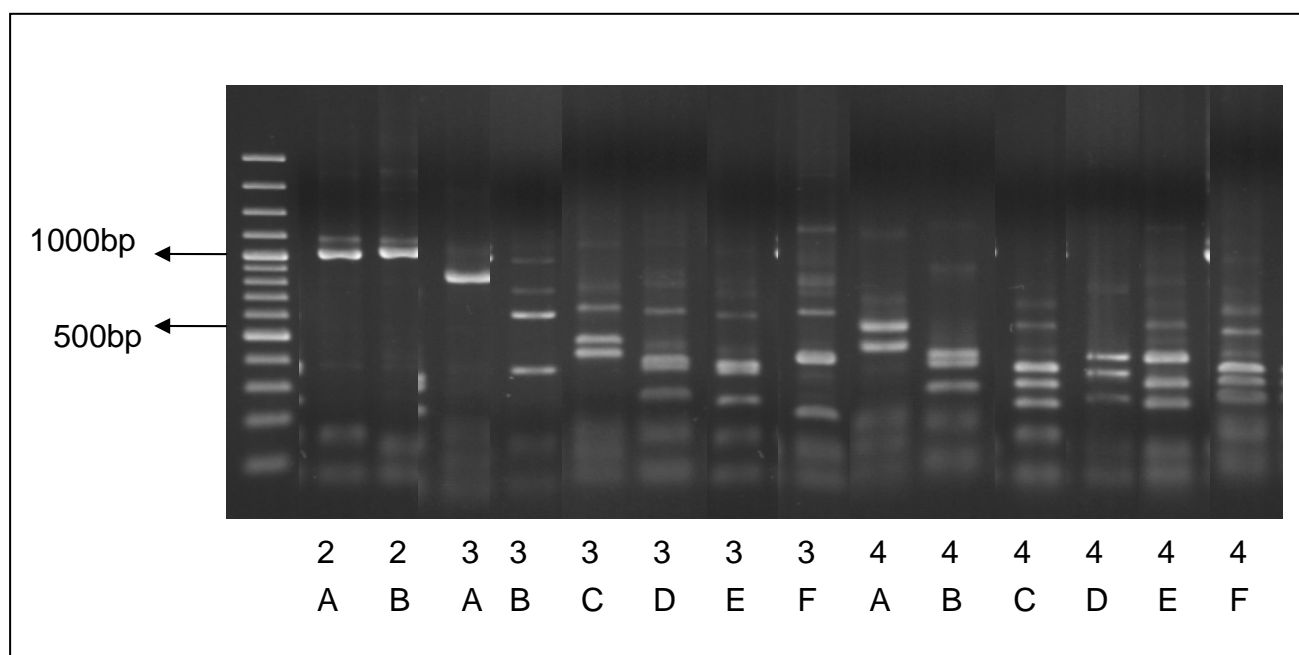


圖 16：古菌的 16S rRNA 基因片段用 *Sau3A* I 切割的 RFLP 類型

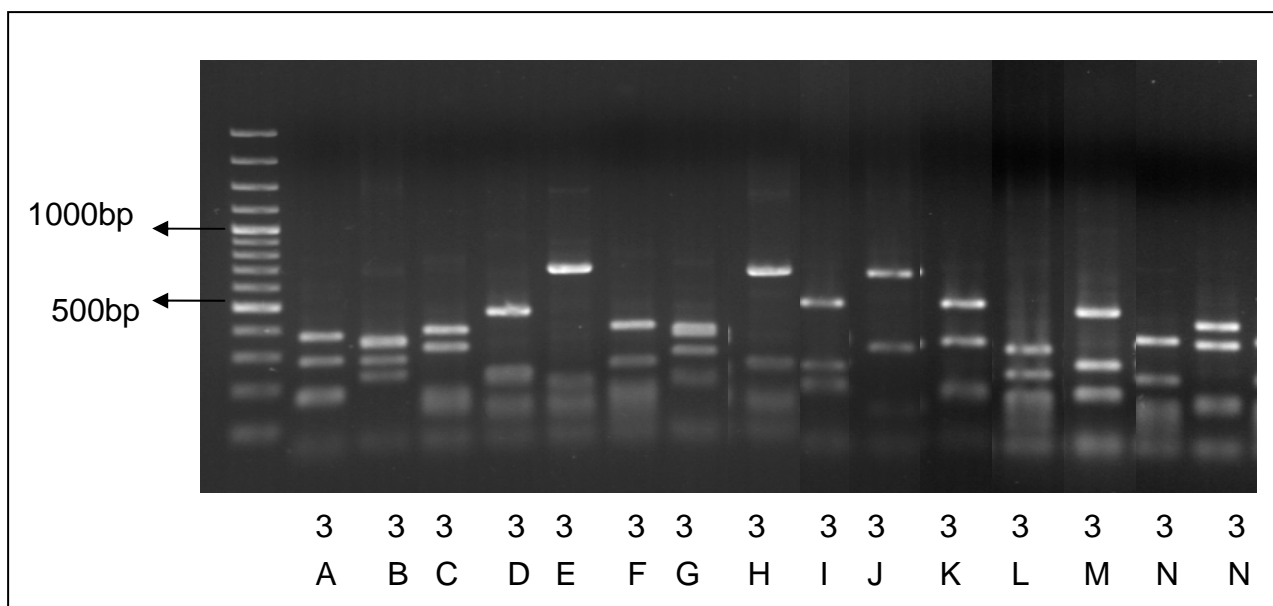
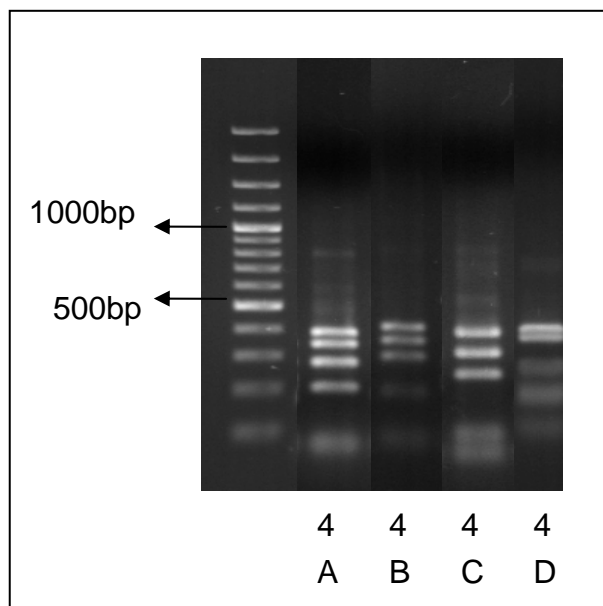
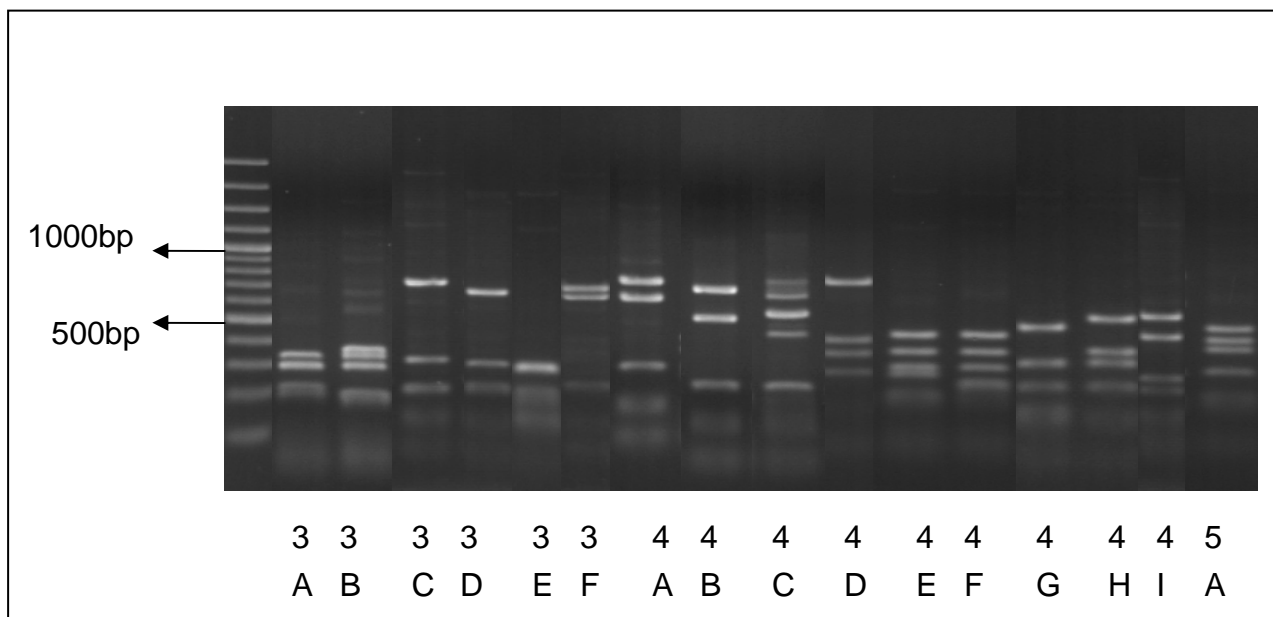


圖 17：古菌的 16S rRNA 基因片段用 Hha I 切割的 RFLP 類型





18：細菌的 16S rRNA 基因片段用 *Rsa* I 切割的 RFLP 類型

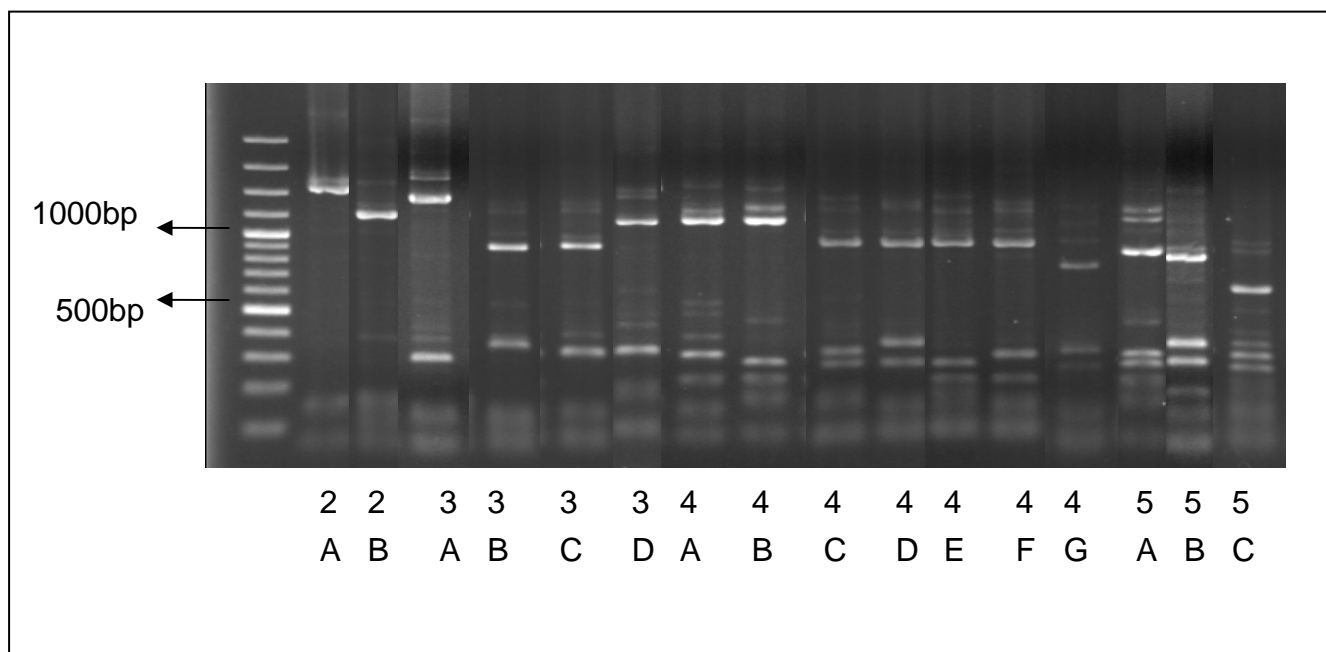


圖 19：細菌的 16S rRNA 基因片段用 *Sau3A I* 切割的 RFLP 類型

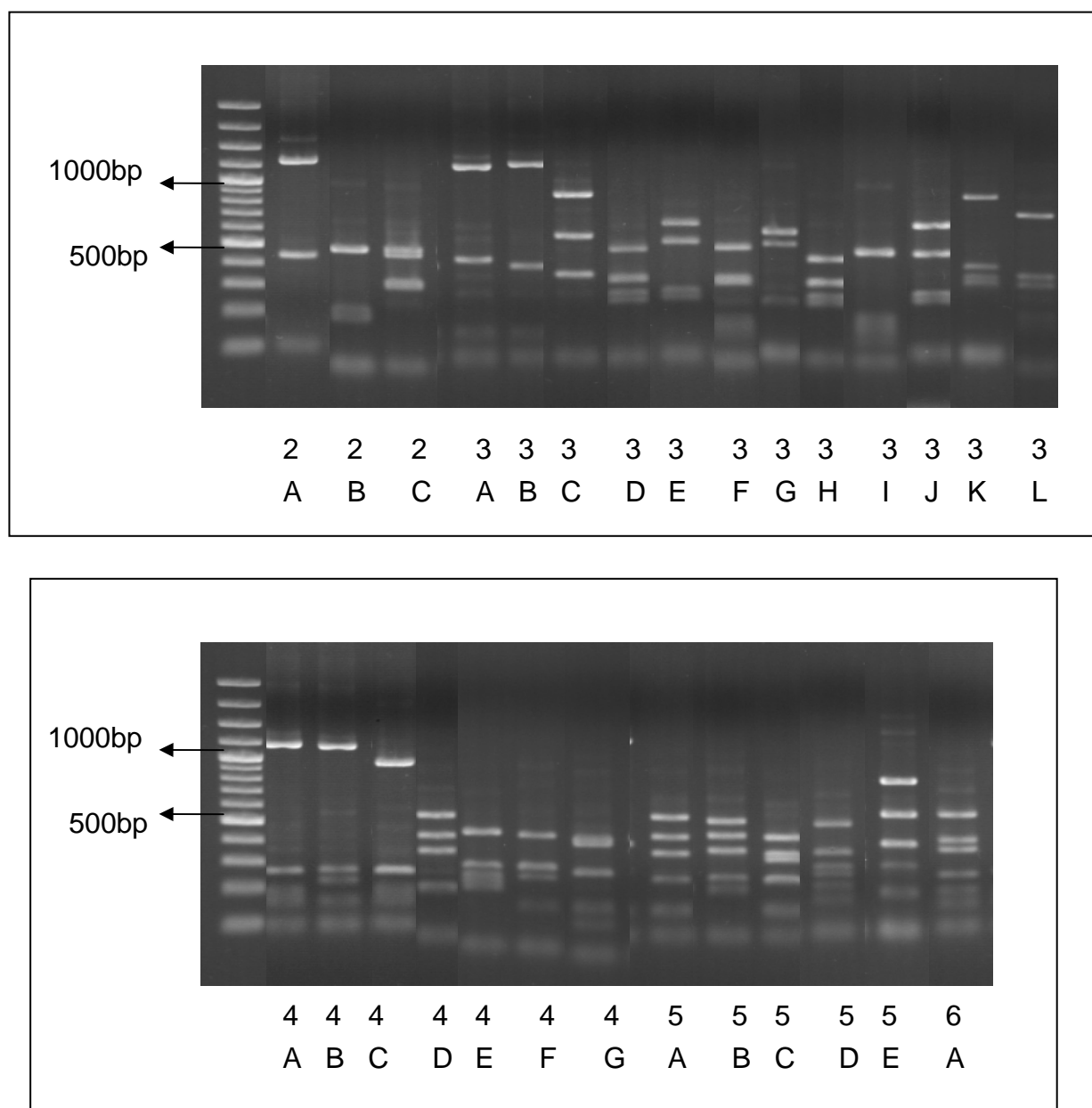


圖 20：細菌的 16S rRNA 基因片段用 Hha I 切割的 RFLP 類型

表 23：各溫泉樣本中古菌 RFLP 類型分佈與多樣性

Number Of RFLP type	RFLP type according to 3 restriction enzymes			Number of clones		
	Rsa I	Sau3A I	Hha I	煨子坪 人工池 (1)	煨子坪 大露頭 (2)	硫磺谷 水泥池 (3)
1	2-A	3-E	3-B			3
2	2-A	4-A	3-A	1		
3	2-A	4-F	3-B			2
4	2-B	2-B	3-N		1	
5	2-B	3-C	3-B		1	
6	2-B	4-B	3-B	3		
7	2-B	4-C	3-B			2
8	2-B	4-C	3-G	3		
9	2-B	4-C	4-C		3	
10	2-B	4-C	5-A		1	
11	2-B	4-F	3-B		2	
12	2-C	2-B	3-E	3		4
13	2-C	2-B	3-F	3	4	7
14	2-C	2-B	3-I	2		
15	2-C	2-B	4-B	1		
16	2-C	2-C	4-A	1		
17	2-C	2-C	3-L		1	
18	2-C	3-A	3-C	1		
19	2-C	3-D	3-F		1	
20	2-C	3-F	4-D			2
21	2-D	2-A	3-K		2	
22	2-D	2-B	3-O		6	1
23	2-E	2-B	3-O		1	
24	2-F	2-B	3-C		1	
25	2-F	3-C	3-C		1	

表 23：各溫泉樣本中古菌 RFLP 類型分佈與多樣性（續表）

Number Of RFLP type	RFLP type according to 3 restriction enzymes			Number of clones		
	Rsa I	Sau3A I	Hha I	煨子坪 人工池 (1)	煨子坪 大露頭 (2)	硫磺谷 水泥池 (3)
26	2-G	2-C	3-M		1	
27	3-A	2-A	3-D	1		
28	3-A	2-A	3-H	3		2
29	3-A	2-A	3-J	2		
30	3-A	3-B	3-B	1		
31	3-B	2-A	3-K			1
32	3-B	4-D	3-K	1		
33	3-C	3-B	2-A		1	
34	3-D	4-C	4-A		1	
35	3-D	4-E	4-C			1
Total number of clones				26	28	25
Richness of RFLP type (S)				14	16	10
Simpon's diversity index (D)				11.3	9.8	6.7
Equitability (evenness) (E _D)				0.80	0.61	0.67
Similarity between sites (1) and (2)				0.17		
Similarity between sites (1) and (3)				0.52		
Similarity between sites (2) and (3)				0.39		

表 24：各溫泉樣本中細菌 RFLP 類型分佈與多樣性

Number Of RFLP type	RFLP type according to 3 restriction enzymes			Number of clones			
	Rsa I	Sau3A I	Hha I	煥子坪 人工池 (1)	煥子坪 大露頭 (2)	硫磺谷 水泥池 (3)	地熱谷 (4)
1	3-A	3-A	2-B			1	
2	3-A	3-C	2-B			1	
3	3-A	4-A	2-A	1			
4	3-A	4-A	3-A	4			
5	3-A	4-A	4-A	1			
6	3-A	4-A	4-B			1	
7	3-A	4-B	3-B	1			
8	3-A	4-B	4-A			1	
9	3-A	4-B	4-B	1			
10	3-A	4-D	3-G				1
11	3-A	4-E	2-B		1	1	
12	3-A	4-E	3-G			1	
13	3-A	4-F	3-G		1	1	1
14	3-B	5-A	4-C	1			
15	3-C	4-C	3-D			1	
16	3-C	4-C	3-H		6		
17	3-C	4-F	3-J		1		
18	3-D	4-D	3-H				1
19	3-D	4-D	4-E		3	5	6
20	3-D	4-F	3-E		1	1	
21	3-D	4-F	4-E				1
22	3-D	4-G	3-K				1
23	3-E	3-A	3-F			1	
24	3-E	4-D	4-E				2
25	3-E	4-E	4-G		1		
26	3-F	3-A	4-H			1	
27	4-A	2-A	6-A	3		1	
28	4-B	2-A	5-A	7		2	
29	4-B	2-A	5-C	1			
30	4-B	2-A	6-A			1	

表 24：各溫泉樣本中細菌 RFLP 類型分佈與多樣性（續表）

Number Of RFLP type	RFLP type according to 3 restriction enzymes			Number of clones			
	Rsa I	Sau3A I	Hha I	煥子坪 人工池 (1)	煥子坪 大露頭 (2)	硫磺谷 水泥池 (3)	地熱谷 (4)
31	4-C	2-A	6-A	1			
32	4-D	2-A	3-B	1			
33	4-E	3-A	4-D	1			
34	4-F	3-A	5-B	1			
35	4-G	2-B	2-C			1	
36	4-G	3-B	4-E				1
37	4-G	4-D	4-E		1		
38	4-G	4-E	2-C		1		
39	4-G	4-E	3-F		2		
40	4-G	4-F	3-I		1		
41	4-G	4-F	4-F		1		
42	4-G	4-F	5-D		1		
43	4-H	3-B	3-G			1	
44	4-H	4-E	2-B		1		1
45	4-H	4-F	3-C		1		
46	4-H	4-F	3-G		1	2	1
47	4-H	5-C	3-L				1
48	4-H	5-C	5-E				1
49	5-A	5-B	3-C	1			
Total number of clones				25	24	24	18
Richness of RFLP type (S)				14	16	18	12
Simpon's diversity index (D)				7.4	9.3	12	6.5
Equitability (evenness) (E_D)				0.53	0.58	0.67	0.54
Similarity between sites (1) and (2)				0			
Similarity between sites (1) and (3)				0.266			
Similarity between sites (1) and (4)				0			
Similarity between sites (2) and (3)				0.367			
Similarity between sites (2) and (4)				0.377			
Similarity between sites (3) and (4)				0.674			

第七節 溫泉中古菌與細菌 16S rRNA 基因片段序列的親源分析

在煖子坪人工池、煖子坪大露頭、硫磺谷水泥池等溫泉中的古菌絕大多數都屬於未曾被分離過的菌株，因此非常值得進一步進行分離純化的研究，可望發現許多新種的古菌（表 25）。至於少數已知種名的古菌皆屬於泉古菌門(Crenarchaeota) 的暖球形菌目(Caldisphaerales) 和硫化葉菌目(Sulfolobales)（表 26）。在細菌方面，煖子坪人工池和硫磺谷水泥池都有相當高比例的菌株屬於未曾被分離過的菌株，尤其是煖子坪人工池（表 27），也非常值得進一步進行分離純化的研究，可望發現許多新種的細菌。此外，煖子坪大露頭、硫磺谷水泥池和地熱谷發現許多已知種名的細菌皆屬於嗜甲基菌屬（*Methylophilus*）和假單胞桿菌屬（*Pseudomonas*），顯示此三處溫泉細菌相較相似而與煖子坪人工池者迥然不同，此結果也與 RFLP 分析結果吻合（表 24）。

表 25：各溫泉樣本中古菌類型分佈

序列比對結果	數目（相似度%）		
	煖子坪人工池(1)	煖子坪大露頭(2)	硫磺谷水泥池(3)
<i>Caldisphaera dracosis</i>	1(96)		
<i>Caldisphaera lagunensis</i>		9(98-99)	3(99)
<i>Metallosphaera hakonensis</i>	1(98)		
<i>Sulfolobus sp.</i>		2(97)	
Uncultured archaeon clone	20(90-99)	15(95-97)	22(96-99)

表 26：本研究所得溫泉樣本中古菌的分類地位

- 初古菌門(Korarchaeota)
- 納古菌門(Nanoarchaeota)
- 泉古菌門(Crenarchaeota)
 - 熱變形菌綱(Thermoprotei)
 - 熱變形菌目(Thermoproteales)
 - 暖球形菌目(Caldisphaerales)
 - 暖球形菌科(Caldisphaeraceae)
 - 暖球形菌屬(Caldisphaera)**
 - 除硫球菌目(Desulfurococcales)
 - 硫化葉菌目(Sulfolobales)
 - 硫化葉菌科(Sulfolobaceae)
 - 硫化葉菌屬(Sulfolobus)**
 - 生金球形菌屬(Metallosphaera)**
 - 餐古菌目(Cenarchaeales)
- 廣古菌門(Euryarchaeota)

表 27：各溫泉樣本中細菌類型分佈

序列比對結果	數目 (相似度%)			
	焮子坪 人工池(1)	焮子坪 大露頭(2)	硫磺谷 水泥池(3)	地熱谷 (4)
<i>Aquabacterium sp.</i>		1(99)		
<i>Delftia sp.</i>		5(99-100)		
<i>Delftia tsuruhatensis</i>		1(99)		
<i>Desulfurella kamchatkensis</i>	2(98)			
<i>Methylophilus methylotrophus</i>			2(99)	
<i>Methylophilus sp.</i>		3(98-99)	2(98)	2(98-99)
<i>Pseudomonas mendocina</i>		4(99-100)	1(99)	1(99)
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>		5(99)	6(99-100)	7(99)
<i>Pseudomonas sp.</i>		2(98)	1(98)	1(99)
Rape rhizosphere bacterium			1(99)	
<i>Stenotrophomonas sp.</i>				2(98-99)
<i>Thiobacillus sp.</i>			1(96)	
Uncultured bacterium clone	21(96-99)	4(99)	11(93-99)	5(94-99)

第四章 結論與建議

第一節 結論

一、整理前人資料發現陽明山國家公園內溫泉酸鹼度範圍在 pH1.5~7，且主要集中在偏酸性的 pH1.5~3.5 及偏中性的 pH5~7 兩個範圍；且偏酸性溫泉的溫度範圍較大，從約 40°C 到接近 100°C，而偏中性溫度的溫度範圍較小且較低，從約 35°C 到約 65°C。含碳酸根的溫泉集中在偏中性範圍且溫度較低，不含碳酸根（但含硫酸根及氯離子）的溫泉則散佈在各種溫度與酸鹼度範圍。含碳酸根的溫泉，其碳酸根含量愈高則 pH 值愈高。不含碳酸根的溫泉，其 pH 值與氯離子含量關係不明確；但硫酸根濃度愈高 pH 值愈低。

二、培養實驗發現強酸性溫泉如地熱谷溫泉、煨子坪溫泉露頭內的微生物只在含 peptone 和 yeast extract 的培養基內才有明顯生長；但酸性較弱的溫泉如四磺坪溫泉、硫磺谷溫泉、媽祖窟溪邊溫泉和煨子坪人工池內的微生物不僅在含 peptone 和 yeast extract 的條件下有明顯生長，在不含有機氮源而以 glucose、sucrose、xylose 為唯一碳源的條件下也有明顯生長。中性含碳酸的媽祖窟浴池、鼎筆橋溫泉和羅漢窟浴池，只有在 pH5 和 pH7 的條件下有明顯生長。羅漢窟浴池溫泉中的微生物似乎只能在含 peptone 和 yeast extract 的條件下才有明顯生長。

三、測試溫泉樣品中的微生物在測試條件下皆不會產生對於格藍氏陰性細菌 *Escherichia coli*、格藍氏陽性細菌 *Staphylococcus aureus*、和酵母菌 *Candida albicans* 有抑制活性的物質。

四、地熱谷溫泉最具開發潛力，除了有分解 starch、cellulose、

chitin 的微生物外，對於 phenanthrene 也可能具有分解潛力。硫磺谷溫泉可能有分解纖維素的嗜酸嗜熱菌，而媽祖窟溫泉可能有分解澱粉的中性嗜熱菌。

五、不同溫泉中的細菌和古菌相對含量並不相同。利用 PCR 進行溫泉樣品 DNA 中 16S rRNA 基因片段的定量，發現強酸性溫泉如地熱谷和煖子坪露頭中的微生物含量非常低，但細菌的相對量似乎略多。弱酸性溫泉如煖子坪人工池、四磺坪和硫磺谷中的微生物含量相當多且似乎古菌較多。接近中性的溫泉如媽祖窟溪邊溫泉和鼎筆橋溫泉則以細菌較多。

六、挑選煖子坪人工池、煖子坪大露頭、硫磺谷水泥池、地熱谷等四處溫泉進行微生物 16S rRNA 基因片段選殖與 RFLP 分析。發現煖子坪人工池中的古菌多樣性最大，此結果與其中古菌量最多相吻合。煖子坪人工池與煖子坪大露頭其中古菌多樣性的相似度最低，同為弱酸性溫泉的煖子坪人工池與硫磺谷水泥池其中古菌多樣性的相似度最高。比較煖子坪人工池、煖子坪大露頭、硫磺谷水泥池和地熱谷溫泉，發現硫磺谷水泥池中細菌的多樣性最大，煖子坪人工池與煖子坪大露頭、地熱谷的細菌相完全不同。

七、在煖子坪人工池、煖子坪大露頭、硫磺谷水泥池等溫泉中的古菌絕大多數都屬於未曾被分離鑑定過的菌株，因此非常值得進一步進行分離純化的研究，可望發現許多新種的古菌。至於少數已知種名的古菌皆屬於泉古菌門 (Crenarchaeota) 的暖球形菌目

(Caldisphaerales) 和硫化葉菌目 (Sulfolobales)。在細菌方面，煖子坪人工池和硫磺谷水泥池都有相當高比例的菌株屬於未曾被分離過的菌株，尤其是煖子坪人工池，也非常值得進一步進行分離純化的研究，可望發現許多新種的細菌。此外，煖子坪大露頭、硫磺谷水泥池

和地熱谷發現許多已知種名的細菌皆屬於嗜甲基菌屬

(*Methylophilus*) 和假單胞桿菌屬 (*Pseudomonas*)，顯示此三處溫泉細菌相較相似而與焮子坪人工池者迥然不同，此結果也與 RFLP 分析結果吻合。

第二節 建議

建議一

將溫泉微生物基本資料納入陽明山國家公園教育解說資料：立即可行建議

主辦單位：陽明山國家公園管理處

過去有關陽明山國家公園內之生態保育資料偏重動、植物。然而與台灣地區其他國家公園相比，陽明山國家公園境內的溫泉實為一大特色。一般民眾對於微生物的認知多半在於病原菌，若能結合溫泉地質與微生物之資料用於解說和保育教育，或可扭轉大眾只知為了泡溫泉而肆意擷取溫泉資源的想法。

建議二

委託學術機構從陽明山國家公園溫泉內進行微生物分離與分類：中長期建議

主辦單位：陽明山國家公園管理處

本研究發現陽明山國家公園溫泉內大多數的微生物都屬於未曾被分離過的菌株，若能長期進行分離研究，將可望發現許多新種的古菌和細菌。非常值得長期研究，以建立具有特色的資料庫。

建議三

委託學術機構從陽明山國家公園溫泉內分離具有降解能力的微生物：中長期建議

主辦單位：陽明山國家公園管理處

具有工業與環保應用潛力的嗜熱嗜酸菌是一項值得開發的生物資源。

建議四

委託學術機構對陽明山國家公園溫泉內微生物的多樣性進行監測：中長期建議

主辦單位：陽明山國家公園管理處

針對不同溫泉進行更廣泛的溫泉內微生物的多樣性進行監測，以期歸納引起變化的因素。

第五章 參考文獻


- 江志文。1998。陽明山高溫紅藻 *Cyanidium caldarium* 熱休克蛋白質之研究。國立台灣大學植物學研究所碩士論文。
- 阮雪芬。1994。陽明山高溫紅藻 *Cyanidium caldarium* 的化學鑑定耐熱生理之探討。國立台灣大學植物學研究所碩士論文。
- 李健瑋。2001。高溫洋菜分解酵素生產菌株之菌種鑑定及洋菜分解酵素之純化。東吳大學微生物學系碩士論文。
- 何佩楨。2004。台灣地區不同溫泉中細菌群落組成的研究。東吳大學微生物學系碩士論文。
- 宋聖榮。2005。陽明山溫泉、地熱資源與利用調查。內政部營建署陽明山國家公園管理處委託研究報告。
- 林基烈。1996。臺灣地區碳酸溫泉矽藻之研究。國立中興大學植物學研究所碩士論文。
- 柯舜文。1996。分離生產葡萄糖異構酵素之高溫嗜酸菌及酵素純化與定性。東吳大學微生物學系碩士論文。
- 翁熊隆。2001。陽明山國家公園全區溫泉水資源利用調查與管理規劃-以龍鳳谷地區為整建示範。內政部營建署陽明山國家公園管理處委託研究報告。
- 陳明賢。2000。高溫長桿菌(*Bacillus stearothermophilus* 91)的分離及其所產高溫穩定澱粉酶純化及特性之研究。國立海洋大學水產養殖學系碩士論文。
- 陳耀麟。2002。大屯火山區溫泉水之化學成分及其對河水之影響。國立台灣大學地質科學研究所博士論文。
- 陳懋彥。2002。台灣地熱區嗜熱性細菌之研究。國立台灣大學植物學研究所博士論文。


- 黃琬琿。1997。陽明山國家公園溫泉與南磺溪水化學之初步研究。內政部營建署陽明山國家公園管理處委託研究報告。
- 梁素雲。1990。硫磺噴氣孔植群生態與其指標植物個體生理生態之研究。國立台灣大學植物學研究所碩士論文。
- 程楓萍。1987。陽明山國家公園溫泉水資源調查與利用規劃及管理。內政部營建署陽明山國家公園管理處委託研究報告。
- 張蒼碧。1966。台灣溫泉藻類之研究。國立台灣大學植物學研究所碩士論文。
- 楊金臻（編著）。1992。《泉鄉》。內政部營建署陽明山國家公園管理處。
- 蔡國正。2000a。嗜酸嗜熱細菌之分離及其酯解酵素性質之研究。國立台灣師範大學生物研究所碩士論文。
- Adams, M. W. W. 1995. Thermophilic Archaea: an overview. In F. T. Robb and A. R. Place (eds.), *Archaea: a laboratory manual -- thermophiles*, pp. 3-7. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Baker, G. C., S. Gaffar, D. A. Cowan, and A. R. Suharto. 2001. Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *FEMS Microbiol. Letters*, **200**: 103-109.
- Bergquist, P. L. and H. W. Morgan. 1992. The molecular genetics and biotechnological application of enzymes from extremely thermophilic eubacteria. In R. A. Herbert and R. J. Sharp (eds.), *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*, pp. 44-75. Blackie & Son, London.
- Boomer, S. M., D. P. Lodge, B. E. Dutton, and B. Pierson. 2002. Molecular characterization of novel red green nonsulfur bacteria from five distinct hot spring communities in Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 346-355.
- Brock, T. D. 1978. *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures*. Springer Verlag, New York.
- Brock, T. D. 1985. Life at High Temperatures. *Science* **230**: 132-138.


- Brock, T. D. (ed.) 1986. *Thermophiles: General, Molecular, and Applied Microbiology*. John Wiley & Sons, New York.
- Cowan, D. A. 1992a. Biochemistry and molecular biology of the extremely thermophilic archaeobacteria. In R. A. Herbert and R. J. Sharp (eds.), *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*, pp. 1-43. Blackie & Son, London.
- Cowan, D. A. 1992b. Enzymes from thermophilic archaeobacteria: current and future applications in biotechnology. In M. J. Danson, D. W. Hough and G. G. Lunt (eds.), *The archaeobacteria: biochemistry and biotechnology*, pp. 149-169. Portland Press, London.
- DeLong, E. F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 5685-5689.
- Ghosh, D., B. Bal, V. K. Kashyap, and S. Pal. 2003. Molecular phylogenetic exploration of bacterial diversity in a Bakreshwar (India) hot spring and culture of *Shewanella*-related thermophiles. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**: 4332-4336.
- Hjorleifsdottir, S., S. Skirnisdottir, G. O. Hreggvidsson, O. Holst, and J. K. Kristjansson. 2001. Species composition of cultivated and noncultivated bacteria from short filaments in an Icelandic hot spring at 88°C. *Microb. Ecol.* **42**:117-125.
- Hugenholtz, P., C. Pitulle, K. L. Hershberger, and N. R. Pace. 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.*, **180**: 366-376.
- Jan, R. L., J. Wu, S. M. Chaw, C. W. Tsai, and S. D. Tsen. 1999. A novel species of thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus yangmingensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**: 1809-1816.
- Kanokratana, P., S. Chanapan, K. Pootanakit, and L. Eurwilaichitr. 2004. Diversity and abundance of *Bacteria* and *Archaea* in the Bor Khlueng hot spring in Thailand. *J. Basic Microbiol.* **44**: 430-444.

- Kvist, T., A. Mengewein, S. Manzei, B. K. Ahring, and P. Westermann. 2005. Diversity of thermophilic and non-thermophilic crenarchaeota at 80°C. *FEMS Microbiol. Letters* **244**: 61–68.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115-175. John Wiley & Sons, New York.
- Norris, P. R. 1992. Thermoacidophilic archaeobacteria: potential applications. In M. J. Danson, D. W. Hough and G. G. Lunt (eds.), *The archaeobacteria: biochemistry and biotechnology*, pp. 171-180. Portland Press, London and Chapel Hill.
- Shieh, W. Y. and W. D. Jean. 1998. *Alterococcus agarolyticus*, gen. nov., sp. nov., a halophilic thermophilic bacterium capable of agar degradation. *Can. J. Microbiol.*, **44**: 637-645.
- Stetter, K. O. 1986. Diversity of extremely thermophilic archaeobacteria. In T. D. Brock (ed.), *Thermophiles: General, Molecular, and Applied Microbiology*, pp.39-74. John Wiley & Sons, New York.
- Stetter, K. O. 1998. Hyperthermophiles: isolation, classification, and properties. In K. Horikoshi and W. D. Grant (eds.), *Extremophiles: microbial life in extreme environments*, pp. 1-24. Wiley-Liss, New York.
- Takai, K. and Y. Sako. 1999. A molecular view of archaeal diversity in marine and terrestrial hot water environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**: 177-188.
- Torsvik, V., L. Øvreås, and T. F. Thingstad. 2002. Prokaryotic diversity—magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* **296**:1064-1066.
- Woese, C. R., O. Kandler, and M. L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains of Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 4576-4579.
- Wu, -R., M.-Y. Chen, Z.-C. Chen, K.-Y. Chen, and S.-S. Tsay. 2000. Fungal flora of hot springs of Taiwan (1): *Taiwania*, **45**: 207-216.

附錄一：本研究採樣點之照片及基本資料

	溫泉名稱 煥子坪 大型露頭	位置 310936 2786180 448m	描述 較高處大型 露頭。有激 烈地熱蒸 汽。溫度 高但不均 勻。
	溫度(°C) 85-95	Bacteria 2^{-1} Archaea $<2^{-3}$	
	pH 1.76		

	溫泉名稱 煥子坪 小露頭	位置 310944 2786818 441m	描述 較高處小 露頭。有 輕微地熱 蒸汽。表 面溫度較 低，底部 溫度迅速 增高。
	溫度(°C) 65-81	Bacteria 2^{-1} Archaea $<2^{-3}$	
	pH 1.68		

	溫泉名稱 煥子坪 人工池	位置 311050 2786962 428m	描述 低處水池。有輕微地熱蒸汽。有冷水(30°C)接管導入，表面 40-50°C，底部 45-48°C。
	溫度(°C) 40-50	Bacteria 2^8 Archaea 2^{10}	
	pH 3.11		


	溫泉名稱 四磺坪	位置 309881 2787770 328m	描述
---	--------------------	--	-----------

附錄一 本研究採樣點之照片及基本資料


	溫泉名稱 四磺坪 水泥池	位置 309881 2787770 328m	描述 約 2 公尺 直徑水泥 圓形池。 灰 黑 色 泥。有明 顯地熱蒸 汽。
	溫度(°C) 69-72	Bacteria 2 ¹ Archaea 2 ⁴	
	pH 3.73-4.94		

	溫泉名稱 四磺坪 露頭	位置 309881 2787770 328m	描述 水泥圓形 池附溫泉 天然湧出 口。有灰 黑色泥。
	溫度(°C) 59-67	Bacteria 2 ¹ Archaea 2 ⁷	
	pH 2.83-3.28		

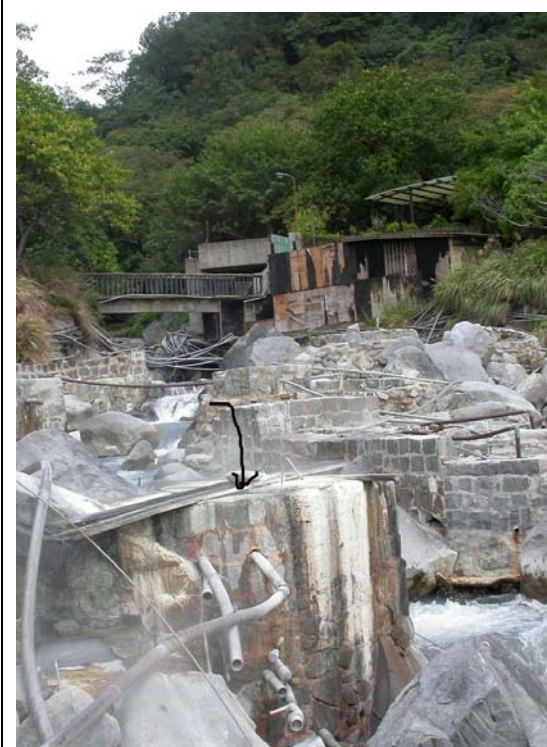
	<p>溫泉名稱 硫磺谷 (大磺嘴)</p>	<p>位置</p>	<p>描述 泉源路旁，惇敘高工東南方谷地。</p>
--	-------------------------------	-----------	-------------------------------

	<p>溫泉名稱 硫磺谷 (大磺嘴) 水泥池</p>	<p>位置 302015 2782014 160m</p>	<p>描述 水泥人工蓄水池。噴氣口有激烈地熱蒸汽與湧泉。</p>
	<p>溫度(°C) 65</p>	<p>Bacteria 2¹</p>	
	<p>pH 4.00</p>	<p>Archaea 2⁴</p>	

附錄一 本研究採樣點之照片及基本資料


	溫泉名稱 硫磺谷 (大磺嘴) 大蓄水池	位置 301942 2782037 158m	描述 大型人工蓄水池。有輕微地熱蒸汽。
	溫度(°C) 56	Bacteria 2 ⁵ Archaea 2 ⁶	
	pH 3.11		


	溫泉名稱 媽祖窟	位置	描述 行義路旁，惇敘高工東南方河谷內。
---	--------------------	-----------	-------------------------------

	溫泉名稱 媽祖窟 溪邊水池	位置 302551 2782088 173m	描述 溪邊人工 水泥池。 噴氣口有 激烈地熱 蒸汽。導 入冷水加 熱。
	溫度(°C) 65	Bacteria 2^{12} Archaea 2^9	
	pH 5.70		


	溫泉名稱 地熱谷	位置 300727 2781382 58m	描述 北投中山 路新北投 公園旁。 天然湧 泉。面積 及水量皆 大。
	溫度(°C) 68-70	Bacteria 2^0 Archaea $<2^{-3}$	
	pH 1.47-1.83		

附錄一 本研究採樣點之照片及基本資料

	溫泉名稱 媽祖窟 私人浴池 (男湯)	位置 302668 2782259 193m	描述 沿溪上 遡。男 湯。
	溫度(°C) 53	Bacteria tr. Archaea tr.	
	pH 6.12-6.70		

	溫泉名稱 羅漢窟 公共浴池 (女湯)	位置 302741 2782476 55m	描述 泉源路龍 鳳谷餐廳 下方河谷 旁。
	溫度(°C) 51		
	pH 7.12		

	<p>溫泉名稱</p>	<p>位置</p>	<p>描述 泉源路鼎筆橋。路邊小路沿溪上溯。</p>
--	-------------	-----------	--------------------------------

	<p>溫泉名稱 鼎筆橋 溫泉</p>	<p>位置 303247 2783345 308m</p>	<p>描述 泉源路鼎筆橋下方的河谷，沿溪上溯約五百米。岩壁滲出。</p>
	<p>溫度(°C) 52</p>	<p>Bacteria 2⁶</p>	
	<p>pH 5.95</p>	<p>Archaea 2⁰</p>	