

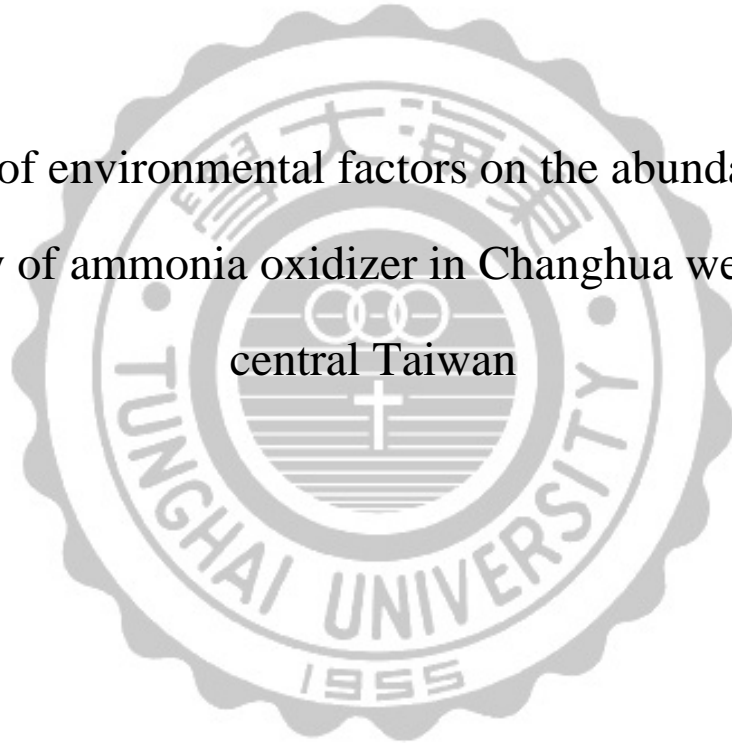
東海大學環境科學與工程研究所

碩士論文

中台灣彰濱濕地底泥氨氧化族群豐度及多樣性與影響

因子研究

Effects of environmental factors on the abundance and
diversity of ammonia oxidizer in Changhua wetlands of
central Taiwan



指導老師：黃啓裕 博士

學生：林昆翰

中華民國一百零五年六月

東海大學碩士班研究生
論文指導教授推薦書

環境科學與工程學系林昆翰君所提之論文

題目：中台灣彰濱濕地底泥氨氧化族群豐度及多樣性與影響因子研究

Effects of environmental factors on the abundance and diversity
of ammonia oxidizer in Changhua wetlands of central Taiwan

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授：黃啟裕 (簽章)

105年6月23日

東海大學環境科學系碩士班

論文口試委員審定書

環境科學與工程學系碩士班林昆翰君所提之論文

題目：中台灣彰濱濕地底泥氮氧化族群豐度及多樣性與影響因子研究

Effects of environmental factors on the abundance and diversity of ammonia oxidizer in Changhua wetlands of central Taiwan

經本委員會審議，認為符合碩士資格標準。

論文口試委員召集人 鄧獻文 (簽章)

委員 賴美津
曹啟裕

中華民國 105 年 6 月 23 日

致謝

從大學剛踏進校園的那一刻，到現在完成研究所的求學過程，算算也已經在東海大學待了不短的一段時間，當初剛踏進實驗室的那個菜鳥，現在也準備進入下一個挑戰了，或許真得像別人說的，到結尾時才感到時間的飛逝吧。

在整個研究所生涯中，首先要感謝的就是實驗室的大家長黃啟裕老師，這段學習過程不僅讓我在學科知識上有所成長，在各種待人處事上也學到了許多。也要感謝兩位口試委員賴美津老師和郭獻文老師，在論文口試中給予重要的意見，使整個論文能更為完整。同時也再次感謝郭獻文老師以及生科系劉少倫老師，能夠出借實驗室設備以及分享實驗室技術，讓整個論文研究能順利完成。另外還要感謝來自彰化海岸生態環境調查監測計畫（UR-10228）的部分經費，支持整個研究的所需費用。

在研究過程中，感謝百淳學長、阿翔以及宥鈞姐在剛進實驗室時，帶我們認識實驗室環境，以及在研究上給予的幫助，還有彰濱採樣時的幫忙，尤其是最後一項真是太感謝了！再來是實驗室的夥伴皓銘，彰濱計畫的採樣辛苦你啦，雖然我們是一起去的，不過在早起這件事上看起來你的難度更高啊。還有先走一步的皓瑋和至榮，分生實驗果然還是一起失敗比較有伴呢。水質家的柑仔，那時後的校外午餐真是太感謝了。最後實驗室的兩位學弟睿致和宗儒，謝謝這段時間裡的幫忙，實驗室接下來就靠你們啦！最後再次感謝在整個求學過程曾幫助過我的人們，謝謝你們！

昆翰

2016/7/26

目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
第一章 前言.....	1
1.1 研究動機.....	1
1.2 研究目的.....	3
第二章 文獻回顧.....	4
2.1 氮循環.....	4
2.2 硝化作用.....	5
2.3 微生物的氨氧化作用.....	6
2.4 氨氧化細菌.....	7
2.5 氨氧化古菌.....	8
2.5.1 氨氧化古菌生理特性及機制.....	10
2.5.2 氨氧化古菌分類.....	12
2.5.3 氨氧化古菌的氨單氧酶.....	13
2.6 AOA 族群生態多樣性.....	14
2.7 分子生物檢測技術.....	15
2.7.1 聚合酶鏈鎖反應.....	16
2.7.2 及時聚合酶鏈鎖反應.....	17
2.8 生物統計.....	18
2.8.1 相關係數.....	18
2.8.2 主成分分析.....	19
2.8.3 稀疏曲線分析.....	21
第三章 材料與方法.....	22
3.1 實驗流程.....	22
3.2 樣區描述.....	22
3.3 土壤採集.....	23
3.4 土壤特性分析.....	23

3.4.1 pH	23
3.4.2 含水率	24
3.4.3 潛在硝化速率	24
3.4.4 總有機碳	25
3.4.5 鹽度	25
3.4.6 氨氮	26
3.4.7 亞硝酸鹽氮	27
3.4.8 硝酸鹽氮	27
3.5 分子生物檢測	28
3.5.1 DNA 萃取	28
3.5.2 膠凝電泳	30
3.5.3 聚合酶鏈鎖反應	30
3.5.4 分子選殖	31
3.5.5 及時聚合酶鏈鎖反應	33
3.5.6 序列分析	34
3.5.7 親緣分析	35
3.6 統計分析	35
3.7 多樣性指標及稀疏曲線	43
第四章 結果與討論	46
4.1 二月土樣調查	46
4.1.1 二月土壤化學特性	46
4.1.2 二月土壤環境因子間的關聯性	47
4.1.3 二月土壤中 AOA 與 AOB 豐度	48
4.1.4 二月土壤環境因子對氨氧化族群的影響	49
4.1.5 二月土壤 AOA 族群組成和演化分析	51
4.1.6 二月土樣整體變量綜合分析	52
4.2 十月土樣調查	53
4.2.1 十月土壤化學特性	53

4.2.2 十月土壤中 AOA 與 AOB 豐度.....	55
4.2.3 十月土樣 AOA 族群結構、多樣性以及親緣分析.....	56
4.2.4 十月土樣稀疏曲線分析.....	58
第五章 結論與建議.....	59
5.1 結論.....	59
5.2 建議.....	60
參考文獻.....	92
附錄.....	100



表目錄

Table 2-1 Classification and characteristics of ammonia oxidizing bacteria (AOB).....	61
Table 2-2 Classification and characteristics of ammonia oxidizing archaea (AOA).....	62
Table 2-3 Energy efficiency of autotropic carbon fixation cycles	63
Table 2-4 Kinetic constants and properties of soil AOA and AOB	63
Table 3-1 Location of the study sites in Changhua	64
Table 3-2 Reagents for PNR determination	64
Table 3-3 Reagents for ammonium determination.....	65
Table 3-4 Reagents for nitrite determination	65
Table 3-5 Agarose gel concentration and efficient range of DNA	66
Table 3-6 PCR primers used for the amplification archaeal and bacterial <i>amoA</i> gene.....	66
Table 3-7 Reagents for PCR reaction.....	66
Table 3-8 Thermocycling for PCR reaction.....	67
Table 3-9 Reagents for Cloning	67
Table 3-10 Medium and blue white screen in cloning procedures	68
Table 3-11 Reagents for colony PCR.....	68
Table 3-12 Thermocycling for colony PCR reaction.....	68
Table 3-13 Reagents for real-time PCR	69
Table 3-14 Thermocycling for real-time PCR reaction	69

Table 4-1 Soil properties of Changhua estuary sediment sample in February.....	70
Table 4-2 Correlationship between various environmental factors in February.....	71
Table 4-3 Correlationship between environmental factors and ammonia oxidizer in February	71
Table 4-4 Soil properties of estuary sediment sample in October	72
Table 4-5 Archaeal amoA gene diversity in different sites sampled in October	72



圖目錄

Fig 2-1 Nitrogen cycle	73
Fig 2-2 Respiratory pathway for ammonia oxidation in AOB (<i>Nitrosomonas europaea</i>)	74
Fig 2-3 HP/HB cycle of crenarchaeal and thaumarchaeal	75
Fig 2-4 Schematic of ammonia monooxygenase of archaea and bacteria	76
Fig 2-5 Schematic of polymerase chain reaction	76
Fig 2-6 Schematic of real-time polymerase chain reaction (TaqMan)	77
Fig 2-7 Schematic of real-time polymerase chain reaction (Sybr Green)	78
Fig 3-1 Flowchart of experimental design	79
Fig 3-2 Location of the study sites in Changhua coastal	80
Fig 3-3 Schematic and sequence points of T&A™ Cloning Vector	81
Fig 3-4 DNA sequence of cloning region in T&A™ Cloning Vector	81
Fig 4-1 Abundance of archaeal and bacterial amoA gene copy numbers in Changhua estuary sediment in February	82
Fig 4-2 Maximum-likelihood phylogenetic tree of ammonia oxidizing archaea amoA based on OTUs sequences in February	83
Fig 4-3 Relative abundance of archaeal amoA gene OTUs in February	84
Fig 4-4 Relative abundance of phylogenetic AOA groups in February	85
Fig 4-5 Principal component analysis integrating variables measured for all regions across entire Changhua estuary sample sites	86
Fig 4-6 Comparison abundance of archaeal and bacterial amoA gene copy numbers in Changhua estuary between different months	87

Fig 4-7 Maximum-likelihood phylogenetic tree of ammonia oxidizing archaea
amoA based on OTUs sequences in October..... 88

Fig 4-8 Relative abundance of archaeal *amoA* gene OTUs in October 89

Fig 4-9 Relative abundance of AOA groups in October 90

Fig 4-10 Rarefaction curves of operational taxonomic units of ammonia
oxidizing archaea..... 91



摘要

氮氧化作用是硝化作用(nitrification)的第一步反應，由氮氧化細菌(ammonia oxidizing bacteria, AOB)及氮氧化古菌(ammonia oxidizing archaea, AOA)所主導。目前對於 AOA 的研究仍處於初步階段，主因其生長速度緩慢，造成在培養及純化上的難度，至今只有培養出 10 株氮氧化古菌。因此，野外環境中以這類微生物為目標的族群調查被視為另一個研究方向。本研究以台灣中部彰化縣河口濕地為研究區域，針對其中的氮氧化古菌和氮氧化細菌為目標，利用其特有的氮單氧酶(ammonia monooxygenase, AMO) 的基因 *amoA* 為生物標記分子，在兩個不同的月份進行環境特性和微生物族群調查。族群調查的部分利用各種分子生物技術來進行，包括聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)、實時聚合酶鏈鎖反應(Real-Time Polymerase chain reaction, qPCR)及核酸定序等，最後利用相關性分析(Pearson correlation)以及主成分分析(Principal component analysis, PCA)等統計方式來分析環境特性如 pH、含水率、TOC、氨氮、亞硝酸鹽、硝酸鹽等和族群間的關聯性。本研究結果顯示，在研究區域中，AOA 的 *amoA* 基因的豐富度為 $1.12 \times 10^5 - 7.11 \times 10^6$ copies/g soil，主要的族群為 Group I.1a 的 *Nitrosopumilus.sp*，AOB 則是 $5.01 \times 10^2 - 3.58 \times 10^8$ copies/g soil。而從統計分析的結果來看，AOA 和 AOB 與底泥土樣中氨氮濃度有正相關性存在，但 AOB 的相關性較 AOA 來的顯著，這也顯示了氨氮對 AOB 的影響較大，同時土壤中的潛在硝化速率(potential nitrification rate, PNR)和 AOA 豐度存在著顯著正相關性，這一結果也證實了此樣區中，AOA 確實主導了氮氧化作用的進行。另外在進一步的分析結果中顯示，此地區的 AOA 族群組成受到土壤鹽度很大的影響，在土壤鹽度 2.23 psu 的樣點中，反而以 Group I.1b 的 *Nitrososphaera.sp* 的 AOA 為主導。

關鍵字：濕地、氮氧化古菌、氮氧化細菌、*amoA* 基因、生物多樣性、主成分分析

Abstract

Ammonia oxidation is the first step during microbial nitrification, such process is driver by two specials groups of microorganism, ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing archaea (AOA). Current knowledge about AOA is still insufficient due to the difficulty of isolating and culturing such microorganisms. There are only ten cultures of AOA till now. Therefore, the study of ammonia-oxidizing microorganism's (AOM) population in their natural habitats has been gained great interests. This study investigated the diversity of AOM in estuary area of Changhua county, central Taiwan. The functional gene *amoA* was used as the biomarker for AOM to study their diversity in this area. Characteristics of soil samples such as pH, water content, organic content, nitrogen (especially ammonium, nitrite and nitrate) and potential nitrification rate (PNR) were analyzed. Abundance and diversity of AOM were investigated by using qPCR and cloned sequencing techniques respectively. The statistical methodology principal component analysis (PCA) was used to analyze the correlation between soil characteristics and abundance of AOA. The results showed that the abundance of AOA in this area was between 1.12×10^5 to 7.11×10^6 copies/g soil, while AOB was 5.01×10^2 to 3.58×10^8 copies/g soil. Among the AOA the *Nitrosopumilus.sp* of Group I.1a dominated in this area. Ammonia concentration had a positive correlation on the abundance of both AOA and AOB, showing a positive impact of ammonia. though the ammonia concentration had relatively great impact on AOB, PNR had a positive correlation on the abundance of AOA showing that ammonia oxidation might mainly driven by AOA in this area. The result also suggested that salinity was a key variable for AOA community structure.

Keywords: Wetland, AOA, AOB, *amoA* gene, Biodiversity, PCA

第一章 前言

1.1 研究動機

近年來，由於各種含氮化學藥品和氮肥的使用，各種民生廢水、農業廢水和工業廢水中的含氮化合物的濃度也跟著提高，廢水中的含氮化合物分為有機氮(organic nitrogen)和無機氮(inorganic nitrogen)，有機氮主要以尿素(urea)、蛋白質(protein)和氨基酸(amino acid)的形式存在，而無機氮則分別以銨(ammonium, NH_4^+)、亞硝酸鹽氮(Nitrite, NO_2^- -N)以及硝酸鹽氮(Nitrate, NO_3^- -N)等形式存在，當這些廢水未經妥善處理就直接排放到自然環境時，會對環境和生態造成嚴重的危害，例如低濃度的氮對於水生生物會造成組織損傷和影響氧氣傳輸等慢性危害，當濃度過高時則會造成抽搐或是死亡。因此，近來對於水體中的含氮化合物的問題，已經引起了廣泛的關注，同時為了確保民眾的公共衛生安全，行政院環保署訂定了地面水體分類及水質標準、飲用水水質標準以及飲用水水源標準來區分水體的適用性以及確定飲水的品質，其中飲用水水源標準中要求氮濃度低於 1 mg/L，而飲用水水質標準中又進一步的要求氮以及亞硝酸鹽氮的濃度需低於 0.1 mg/L，同時也要求硝酸鹽氮濃度不可高於 10 mg/L。

廢水中的除氮一直以來都是備受關注的研究方向，目前的除氮方式主要分為生物和物化兩種，物化處理的方式雖然可降低土地需求，但由於成本昂貴，目前大多只有高科技產業是利用這種方式進行除氮，而目前生物除氮技術可以處理一般民生市政污水以及大部分的工業廢水和畜牧廢水等，也因此目前還是以生物處理為主要的除氮方式。生物除氮主要區分為兩個階段，硝化作用(Nitrification)以及脫硝作用(Denitrification)。氮先經由硝化作用轉變成硝酸鹽氮，再經由脫硝作用將硝酸鹽氮轉變成氮氣來達到除氮的效果。而整個除氮過程中，由於進行硝化作用的菌群生長較為緩慢，所以整體除氮效率也受到這一步的影響，也因此這一步驟是整個除氮過程中關鍵的一環。

硝化作用通常分成兩個階段，分別是氨氧化作用和亞硝酸氧化作用，其中的氨氧化作用作為硝化作用的第一步，成為整個硝化作用的限速步驟，這一步驟是先將氨氮氧化成亞硝酸鹽氮，之後藉由亞硝酸氧化作用轉變成硝酸鹽氮，通常這兩個步驟被認為是由氨氧化細菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)和亞硝酸氧化菌(nitrite-oxidizing bacteria, NOB)來執行。近年來的研究揭示了氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)的存在，同時也發現在某些環境中氨氧化古菌明顯擁有高於氨氧化細菌的優勢，例如酸性土壤、貧營性區域或是極端環境中，在這些環境中氨氧化細菌的存在往往是難以被發現的，而這也代表了這些區域中氨氧化作用的進行是由氨氧化古菌來主導，因此氨氧化古菌的發現也大大的擴展了以往對於硝化作用的認知，同時也對整體氮循環有更深入的了解。

目前氨氧化古菌的研究已引起廣泛的關注，對於其生理生化特性也已經有初步的了解，但礙於氨氧化古菌的生長速度緩慢，在培養分離純化的過程中存在著不小的難度，這也使得無法對這些微生物有更進一步的了解，例如其中最重要的代謝過程到目前為止依舊是不明確的狀況，因此，野外的氨氧化古菌族群分析是目前另一個針對這些微生物的研究方向，一方面可以藉由氨氧化古菌在野外對於各種因子的反應來探討其特性，另一方面也可以在這些環境中，更完整的去了解氮循環的過程。

1.2 研究目的

由於氮氧化古菌的培養不易，因此本研究採不依賴培養(culture-independent)的研究方法來對野外氮氧化古菌進行探討，主要是利用環境因子和微生物豐富度之間的關聯性進行分析，並以實驗結果與其他文獻進行比較，來分析此區域中影響氮氧化族群的主要因子，同時確定此區域中氮氧化古菌及氮氧化細菌何者主導了氮氧化作用的進行，最後對於這區域中的氮氧化古菌族群結構進行一個初步的探討，來瞭解這一環境中氮氧化古菌的族群分布情況。

研究樣區選定台灣中部的彰化沿岸地區，從實驗室所參與的其他研究中有機會到此地區進行調查，同時也從調查結果確定此地區有氮氧化族群所需要的基質—氨氮的持續流入，因此決定以此區域為樣區進行野外環境的氮氧化族群研究。研究前期包括了野外採樣和物化特性分析，以及生物技術的部分包括了DNA萃取、聚合酶鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)、即時聚合酶鏈鎖反應(Real-Time Polymerase chain reaction 或稱 Quantitative PCR, qPCR)、Cloning 和 DNA 定序(DNA sequencing)，後期則是進行數據分析，並利用統計方法的相關性分析以及主成分分析來進一步探討，來找出此環境中的主要影響因子和主要氮氧化族群。

第二章 緒論

2.1 氮循環

「氮」在自然界中是常見的元素，普遍的型態為氣態的氮氣，這也是大氣中含量最多的氣體，約佔總氣體體積 78.09 %。在工業上存在許多用途廣泛的含氮化合物，例如氨、硝酸及氰化物等，而在生物體中也是不可或缺的存在，構成了有機體中的胺基酸及核酸等重要部分。氮原子間有非常牢固的化學鍵結，因此不管是工業上或是在生物體中，氮氣轉化成可利用的含氮化合物這一過程都是非常不容易的，對於大部分的生物，氮氣無法直接利用，需藉由其他方式轉化成可利用的含氮化合物，而這些轉換過程，則構成了全球的氮循環。

目前普遍已知的氮循環 (Fig 2-1) 過程主要包括了固氮作用 (nitrogen fixation)、硝化作用 (nitrification)、脫硝作用 (denitrification) 以及近年來新發現的厭氧氨氧化作用 (anaerobic ammonium oxidation, ANAMMOX)，經由這些催化過程，氮在各個形式的含氮化合物間轉換，而生物則藉由同化作用 (assimilation) 將可利用的含氮化合物吸收，轉變成生物體中的有機氮 (organic nitrogen)，這些有機氮再經由微生物分解生物的排泄物或是遺體而轉變回無機氮 (inorganic nitrogen)，這一個微生物分解有機氮的過程稱為氨化作用 (ammonification) 或稱礦化作用 (mineralization)。

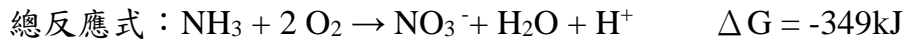
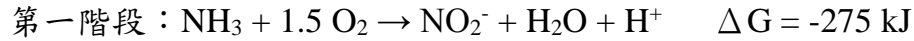
固氮作用可分為人工固氮和自然固氮，人工固氮一般是透過化學方式將氮氣轉化成含氮的化合物，目前常用方式為哈伯法，簡單來說是將氮氣和氫氣在高溫高壓下利用催化劑進行反應來產生氨，而自然固氮則可分成氣電固氮和生物固氮，其中生物固氮是自然界中主要的固氮途徑，這過程是固氮微生物利用固氮酶 (nitrogenase) 將空氣中的氮氣轉化成氨氣；而氮氣轉變成微生物較好利用的氨氣後再藉由細菌的硝化作用，經由兩個連續的步驟從氨氣轉變成亞硝酸鹽氮再轉化成硝酸鹽氮，之後再從兩個不同的途徑還原回氮氣，這兩個途徑分別為脫硝作用和厭氧氨氧化作用。

脫硝作用是指微生物將硝酸鹽氮經由反應先轉變成亞硝酸鹽氮，最後通過一系列的中間產物（NO、N₂O）還原回氮氣，主導這一過程的微生物一般稱為脫硝菌（Denitrifying bacteria），這類的微生物主要以異營性居多，雖然到目前為止有發現自營性的脫硝菌，但脫硝作用在大多數環境中還是以異營性脫硝菌為主導，因此，在廢水處理廠中進行生物除氮時，有些情況會添加一些有機碳源（甲醇），以此來讓脫硝過程順利進行。

厭氧氨氧化作用是微生物在缺氧環境下，把亞硝酸鹽作為電子接受者來將銨離子（NH₄⁺）轉變成氮氣，這類微生物稱為厭氧氨氧化菌，屬於浮黴菌門（Planctomycetes），到目前為止還未有成功分離的純菌株，也因此還沒有正式的分類和命名，如同其他浮黴菌門的細菌一般，厭氧氨氧化菌同樣具有細胞內膜的結構，這一結構可將厭氧氨氧化過程產生的有毒中間產物與細胞隔絕，來防止有毒化合物對細胞的損害。作為將含氮化合物轉變成氮氣的這一過程，厭氧氨氧化作用與脫硝作用在自然界中存在著重要意義，這兩種作用組成了自然界中固定的氮元素重新回到大氣中的途徑。

2.2 硝化作用

在整個氮循環中，硝化作用由於其主導的菌群主要為自營性菌，生長速度緩慢，也因此是整個循環中的限速步驟，成為整個氮循環中的關鍵部分。整個硝化過程可分成兩個階段，第一個階段是氨氧化作用（ammonia oxidation），此階段是微生物將氨氮經由羥胺（NH₂OH）轉變成亞硝酸鹽氮，這一過程以往被認為是由氨氧化細菌（ammonia-oxidizing bacteria, AOB）所主導，但近年來的研究發現氨氧化古菌（ammonia-oxidizing archaea, AOA）對這一過程的貢獻超出了我們以往的認知，也因此目前認為是由這兩種菌群來主導氨氧化作用（Nicol and schleper., 2006）。而第二個階段則是亞硝酸鹽氧化作用，此過程由亞硝酸鹽氧化菌（nitrite-oxidizing bacteria, NOB）所主導，負責將亞硝酸鹽氮氧化成硝酸鹽氮。反應式如下：



2.3 微生物的氮氧化作用

在硝化作用中，氮氧化作用作為硝化作用的第一步成為整個作用中的速率決定步驟，因此在整個氮循環中是關鍵的一環。氮氧化作用可分成兩個步驟，第一個步驟是氮氧化菌以氨單氧酶（ammonia monooxygenase, AMO）將氨氮轉化成羥胺，羥胺在第二個步驟中利用羥胺氧化還原酶（hydroxylamine oxidoreductase, HAO）氧化成亞硝酸鹽氮。從微生物細胞的角度來看（以 *Nitrosomonas europaea* 為例），氨氮首先被吸收到 *N. europaea* 細胞壁的周質（Periplasm）中，經過細胞膜上的氨單氧酶催化，與氧氣分子一起被轉變成水和羥胺，之後再藉由周質中的羥胺氧化還原酶轉化成氨離子和亞硝酸同時釋出電子，轉化後的亞硝酸被排出細胞外膜，釋出的電子則透過細胞色素（cytochrome）轉移，一部分回到氨單氧酶進行氨氮的催化，一部分進入電子傳遞鏈到最後的三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）合成來獲得細胞所需的能量（Fig2-2）。

氨單氧酶(AMO)是位於氮氧化細菌細胞膜上的酵素，其中含有 AmoA (α -subunit)、AmoB(β -subunit)以及 AmoC(γ -subunit)三個亞基(subunit)，而這三個亞基分別由 *amoA*、*amoB* 以及 *amoC* 三個基因所構成，以此組合成操縱子(operon)來轉譯成酵素蛋白質。AmoA 是 AMO 酵素活化位置的膜蛋白，分子量介於 27~30 kDa，AmoB 則是含有鐵和銅離子的蛋白，分子量約介於 38~43 kDa，而 AmoC 是最晚被發現的，分子量約為 24 kDa。AMO 是個含有鋅、銅和鐵離子的金屬酵素(metalloenzyme)，和 pMMO、pBMO 以及 pXMO 等酵素同樣都是含銅膜單氧酶(copper membrane monooxygenases, CuMMOs)，屬於同一個酵素群組，在特性上也有其相似

處，例如 AMO 在基質利用上是以氨氮為主，但與噬甲烷菌的顆粒型甲烷單氧酶（particulate methane monooxygenase, pMMO）同樣都可以氧化一些小分子的有機物，例如苯、芬以及甲烷等 40 多種的化合物 (McCarthy, 1999)。

羧胺氧化還原酶（HAO）存在於氨氧化菌的細胞周質中，這一酵素由 *hao* 基因所構成，一般在氨氧化菌中含有 3 個 copy，任何一段 *hao* 基因失去功能，另外兩段基因還可以替補，以此來保持功能的完善。氨氧化菌的 HAO 主要功能是將羧胺氧化成亞硝酸鹽，在這一過程中會產生一氧化氮（NO）這一中間產物，在好氧情況下此中間產物會快速地被轉變成亞硝酸鹽，而在缺氧情況下則會從其他途徑釋放出細胞外。HAO 在異營性的氨氧化菌中可同時進行硝化和脫硝，當其存在於好氧的情況下，HAO 會進行一般的功能將羧胺氧化成亞硝酸鹽，但存在於厭氧條件時，HAO 可以將羧胺轉化成氧化亞氮（ N_2O ）。

2.4 氨氧化細菌（ammonia oxidizing bacteria, AOB）

氨氧化細菌最早於 1892 年發現其存在 (Winogradsky, 1892)，到目前已經過了一百多年的研究，現今這類細菌的生理特性、代謝機制以及親緣關係已經有了完整的認知。氨氧化細菌最初被依據形態特徵來分成 5 個屬 (genera)，包含了 *Nitrosomonas*、*Nitrosococcus*、*Nitrospira*、*Nitrosolobus* 及 *Nitrovibrio* (Watson *et al.*, 1989)。而後進一步利用 16S rRNA 基因序列進行親緣分析後的結果將氨氧化細菌劃分成兩大集群 (Head *et al.*, 1993; Teske *et al.*, 1994)，其中有 β -變形菌綱 (β -proteobacteria) 和 γ -變形菌綱 (γ -proteobacteria)，目前大部分已知的氨氧化菌都屬於 β -變形菌綱，只有 *Nitrosococcus* 這一菌屬被分類到 γ -變形菌綱 (Table 2-1)。

氨氧化細菌屬於化學自營的格蘭氏陰性菌，在好氧情況下利用卡爾文循環 (Calvin cycle) 固定大氣中二氧化碳做為細胞碳源，同時氧化氨來做為能量來源。但也有部分氨氧化細菌是屬於化學異營菌，這類細菌定義較

為廣泛，通常可指那些在代謝過程中也可以進行氨氧化作用的菌群，此異營性氨氧化細菌在好氧情況時可將羥胺經過酵素催化轉變成亞硝酸鹽，在厭氧環境時則會把羥胺轉變成氧化亞氮，與自營性氨氧化細菌相比，某些異營性氨氧化菌在高碳氮比的條件下可進行同時硝化和脫硝（Kuenen and Robertson, 1994），讓氮氣可以直接經由循環轉變成氮氣回到大氣中，所以異營性的氨氧化菌在環境中也存在著一定的重要性，但異營性的氨氧化作用通常並非該菌種獲得能量的主要來源，大部分只是為了保護自體或增加競爭優勢所進行的二次代謝的作用產生的結果（Prosser, 1989），例如 *Alcaligenes faecalis* 會利用氨氧化過程中所產生的有毒產物羥胺來抑制其他菌種使本身在環境中具有優勢（honda *et al.*, 1998），因此異營菌進行氨氧化所產生的能量往往無法滿足其生長所需，所以大部分環境中的氨氧化作用還是由自營性的氨氧化菌所主導。

2.5 氨氧化古菌（ammonia oxidizing archaea, AOA）

一個世紀以來，人們認為氨氧化作用是由氨氧化細菌所執行並在各種環境中主導其進行，直到 2005 年 Könneke 等人成功從一處熱帶水族箱中分離純化了一株具有氨氧化功能的泉古菌 *Nitrosopumilus maritimus*（Könneke *et al.*, 2005），氨氧化古菌的存在也終於被證實，在這之後也有越來越多的學者投入對於氨氧化古菌的研究。近年來對於氨氧化古菌的型態、特性以及生理代謝等已經有了一定程度的了解，利用富集培養（enrichment）方式也成功地從許多環境中培養出不同的氨氧化古菌（Table 2-2），這也使得人們對於氮循環的認識有更進一步的擴展。

氨氧化古菌同樣屬於化學自營菌，與氨氧化細菌的特性相似，利用氧化氮氣作為能量源，同時將大氣中的二氧化碳作為碳源，來合成自身所需有機物。與氨氧化細菌不同的地方在於，氨氧化古菌可在基質濃度極低的貧營環境中生存，對於溶氧的需求也較低，同時在極端環境也有較好的

適應性，在上述情況下的環境中，氨氧化細菌往往是不利於生長或無法生長，因此氨氧化古菌在這些環境裡可以做為初級生產者而佔據優勢地位 (Santoro *et al.*, 2011)。但從文獻的結果也顯示，氨氧化古菌對於氨氮濃度的耐受性較氨氧化細菌來的低 (Park *et al.*, 2010)，所以氨氧化古菌雖然可以在極低氨氮濃度的情況下生長，但若是環境中的氨氮濃度提高，氨氧化古菌會比氨氧化細菌更快受到抑制，因此在一些氨氮濃度極高的環境中，例如汗水處理廠，氨氧化作用通常還是由氨氧化細菌所主導。

氨氧化古菌在環境中的分布廣泛，從深海底泥到高山凍土中都可以發現其存在，從目前研究來看，水域環境包括淡水溪流、湖泊、地下水 (Santoro *et al.*, 2008)、河口以及海洋的表層透光區 (Mincer *et al.*, 2007) 和深海區域 (Nakagawa *et al.*, 2007)，陸域環境則包括花園土壤、農牧土壤 (Leininger *et al.*, 2006)、森林土壤、濕地底泥、酸性土壤以及鹼性土壤等 (Shen *et al.*, 2008)，此外還有一些極端環境包括了高溫熱泉 (Zhang *et al.*, 2008)、地熱礦坑 (Spear *et al.*, 2007)、高山永凍帶以及南北極等 (Kalanetra *et al.*, 2009)，都可以發現氨氧化古菌的存在，且除了一些高氨氮濃度的環境以外，氨氧化古菌的基因數量往往可以高過氨氧化細菌 2~3 個等級 (Liu *et al.*, 2010)，這也顯示了氨氧化古菌在大多數的自然環境中扮演了主導氨氧化作用的角色，並在這些區域中擔起了推動氮循環的責任。

2.5.1 氮氧化古菌生理特性及機制

氮氧化古菌一般是利用氮氧化作用來獲得生長所需能量，並透過大氣中的二氧化碳來取得生長所需碳源，屬於化能自營性微生物，不過到目前為止氮氧化古菌對於基質的代謝機制還未有完整的了解，因此對於其整體代謝路徑只能由現有的研究來進行推測，先前有部分文獻提出氮氧化古菌進行氮氧化時的中間產物可能為次硝酸（HNO）而非氮氧化細菌代謝時的中間產物羧氨（Schleper, 2010），同時也發現到氮氧化古菌缺少了編碼 HAO 酵素的基因以及回收電子的細胞色素 C（cytochrome c）（Zhalnina *et al.*, 2012），這些研究將氮氧化古菌的氮氧化代謝過程導向兩個可能的猜測，一是氮氧化古菌有一個新穎的酵素來進行羧氨的氧化，或是氮氧化古菌將氮氧化成其他中間產物而非羧氨，而一篇針對 *N.maritimus* 的研究證實了氮氧化古菌的氮氧化過程中間產物確實是羧氨（Vajrala *et al.*, 2013），這也表示氮氧化古菌雖然缺少了類似於氮氧化細菌的 HAO 酵素，但其本身擁有另一套酵素系統來進行整個氮氧化的過程。

氮氧化古菌的碳源與氮氧化細菌相同，皆以大氣中的二氧化碳來做為細胞生長所需的碳，不過兩者的固碳方式有所不同，氮氧化細菌是利用卡爾文循環（Calvin cycle）來固定大氣中的二氧化碳，氮氧化古菌則是利用改進過的 3-Hydroxypropionate/4-Hydroxybutyrate（3HP/4HB）循環來固定二氧化碳，3HP/4HB 循環是在 2007 年提出，藉由針對古菌的研究所發現到存在著不同於當時已知的固碳方式（Berg *et al.*, 2007），這一循環首先將一個 acetyl-CoA 分子和兩個 HCO_3^- 分子轉變成 succinyl-CoA，再經過一系列的反應將 succinyl-CoA 轉化成兩個 acetyl-CoA，其中一個 acetyl-CoA 回到循環中，另一個則經由生物合成轉變成 pyruvate，最後轉化成 glyceraldehyde 3-phosphate。

而改進後的 3HP/4HB 循環則是在 2014 年提出，此研究針對氮氧化古菌 *N.maritimus* SCM1 的固碳酵素進行探討，進而發現氮氧化古菌的

3HP/4HB 循環與其他古菌有所不同 (Könneke *et al.* 2014)，因此將此循環又分別命名成 Crenarchaeal HP/HB cycle 以及 Thaumarchaeal HP/HB cycle，其中 Thaumarchaeal HP/HB 循環有幾項與原本的循環明顯不同的部分，首先，在 3-Hydroxypropionate 以及 4-Hydroxybutyrate 的活化程序中使用的是 ADP (adenosine diphosphate) 所產生的酵素而不是 AMP (adenosine monophosphate) 產生的酵素，因此每個循環所需要的高能鍵比起原本的循環少了 2 個 (Table 2-3)。另外，在 Thaumarchaeal HP/HB 循環中參與了複雜的酵素來催化複數的反應，例如 acetyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase 以及 3-hydroxypropionyl-CoA dehydratase/crotonyl-CoA hydratase 等，這也有效的降低了氨氧化古菌在蛋白質合成時的成本，而這些差異也使得此循環在能量使用上更有效率，同時也提供了氨氧化古菌在氨氮可利用性低的區域裡的主導地位一個合理的解釋。

雖然目前的研究都以自營性氨氧化古菌佔大多數，但有研究指出一部分 Group I.1b 的氨氧化古菌缺乏固定二氧化碳的能力 (Mußmann *et al.*, 2011)，同時也有研究發現某些氨氧化古菌在某些情況下可以利用有機碳，例如 *Nitrososphaera viennensis* 會使用 pyruvate 等有機物 (Tournier *et al.*, 2011)，這些研究結果顯示了混營性 (mixotrophy) 的氨氧化古菌的存在，文獻也針對煉油廠廢水處理系統中的氨氧化族群進行調查 (Mußmann *et al.*, 2011)，結果顯示此區域的古菌 *amoA* 基因活性存在，但氨氧化作用幾乎由氨氧化細菌來執行，這或許也代表著異營性的氨氧化古菌在環境中的存在。

2.5.2 氨氧化古菌分類

現今氨氧化古菌的分類通常是利用 16S rRNA 以及 *amoA* 基因來進行，在進行菌種序列比對時，利用序列中保守以及變異區域來分析其親緣關係，同一菌種的判定通常以 97 % 相似度為基準，高於 97 % 相似度時可判斷為同一菌種，反之則認定為相異菌種。早期的研究會利用 16S rRNA 基因來進行氨氧化古菌的分類，這一鑑定方式可將氨氧化古菌大致分成兩類，一類是菌種來源主要為海洋、淡水湖泊等自然水體以及底泥的 Group 1.1a 分支。另一類是來自於土壤以及大多數陸域生態系統的 Group 1.1b 分支 (Stahl and Torre., 2012)。不過此方式在鑑定菌種上雖然可將氨氧化古菌進行初步分類，但有研究指出在利用 16S rRNA 基因作為分類工具時，對於辨識氨氧化古菌以及其他古菌上有所不足 (Francis *et al.*, 2005)，在分類時可能無法有效判別，這也表示在使用 16S rRNA 基因來當作鑑定氨氧化古菌的工具時，可能無法準確的判斷出是否為氨氧化古菌，因此越來越多的研究開始找尋更為理想的鑑定方式。

amoA 基因是氨氧化菌群的特殊功能性基因，對應的 AmoA 亞基是 AMO 酵素的活化膜蛋白，而氨氧化古菌和氨氧化細菌的 *amoA* 基因在序列上只有 60 % 的相似性 (Liu *et al.*, 2010)，利用設計過的引子可有效的對應擴增到古菌和細菌的 *amoA* 基因，在環境檢測上此基因被認為是理想的生物標記，近來在分析環境中氨氧化族群的物種、豐度、分佈以及親緣關係時也多以 *amoA* 基因為主，同時在親緣分析上比起 16S rRNA 系統更進一步的分類出兩個分支，分別是 group I.1a-associated 以及獨立於海洋以及土壤分支的 ThAOA group (Stahl and Torre., 2012)，後者主要來源為熱泉等地熱生態系統，而這些結果也再次證明 *amoA* 基因比 16S rRNA 基因更適合用於氨氧化古菌的分類。

2.5.3 氨氧化古菌的氨單氧酶 (AMO)

氨單氧酶是氨氧化微生物所特有的一種酵素，而這一酵素在氨氧化古菌和氨氧化細菌之間在基因以及特性等方面都有所差異。從特性上來看，氨氧化古菌的反應速率約 0.57 fmol NH₃/cell/hr，遠低於氨氧化細菌的 4 – 23 fmol NH₃/cell/hr (Table 2-4)，但古菌對於基質的半飽和常數 (half-saturation constant, K_m) 也同樣低於氨氧化細菌，以 *Nitrosopumilus maritimus* 為例， K_m 值為 133 nM (Martens-Habbena *et al.*, 2009)，與氨氧化細菌相比低了約 200 倍，而在基質利用閾值 (substrate threshold) 上小於 10 nM，更低於目前已知的氨氧化細菌。

從親緣分析的結果表明，此酵素基因在古菌和細菌間在系統發育早期就已屬於不同的分支，其基因同源性較小 (Nicol and schleper., 2006)，同時此酵素的三個亞基基因 *amoA*、*amoB* 以及 *amoC* 在古菌及細菌中的排列方式也有顯著差異 (Fig 2-4)，其中氨氧化細菌的 *amo* 基因在排列上較為保守，不同的氨氧化細菌間無顯著差異，而氨氧化古菌則相反，氨氧化古菌的 *amo* 基因在排列上較為多變，不同來源的氨氧化古菌存在著不同的排列方式，甚至有缺少其中一段基因或是多出一段基因的情況出現，例如從土壤來的氨氧化古菌中缺少了 *amoC* 基因，同時在 *amoA* 及 *amoB* 操縱子間也有功能未知的基因插入 (Nicol and Schleper, 2006)。

更進一步來看，古菌和細菌的三個氨單氧酶亞基的基因序列上雖然有所差異，不過兩者的氨單氧酶胺基酸序列上約有 25 % 的一致性以及 40 % 的相似性存在 (Nicol and Schleper, 2006)，在整體結構上也有一定的相似度，且古菌和細菌的 *AmoA* 亞基雖然在胺基酸序列上雖然相似度較低，但兩者皆具有同一酵素家族所特有的 10 個胺基酸序列 (Treich *et al.*, 2005)，從以上結果中可推斷出此酵素在古菌和細菌間具有相同的演化史，並且屬於同一個酵素蛋白家族。

2.6 AOA 族群生態多樣性

生物多樣性通常指的是在一個區域、生物群系或是更大的範圍內的基因、物種或是生態系統的變化，藉由空間的概念又可劃分成 α 多樣性(local)、 β 多樣性 (between-habitat) 以及 γ 多樣性 (regional) 三個層面。而微生物生物多樣性則又更為複雜，微生物的多樣性是包含了所有微生物在分類、遺傳和生態系統上的歧異，以及微生物在生命形式和生態過程上的差別，光從遺傳多樣性來看，這些差異就比高等生物來的更為顯著，不同物種或不同族群間的遺傳基因和基因表現上往往存在著明顯的不同。

而目前對於氨氧化古菌的研究中，由於培養的不易，也多採取環境調查的方式進行，在這些調查中，對於生物多樣性的部份上大多為基因多樣性的調查方式，主要是以氨氧化古菌的基因差異來對其進行分類，以此來將氨氧化古菌進一步的分成各個群類，簡單來講，會將氨氧化古菌利用特定基因（如 16S rRNA 或 amoA）來進行分類，並利用其片段基因的相似度（通常為 95% 相似性）來判斷是否屬於同一個群類，在分類上通常以一個操作分類單元 (Operational taxonomic unit, OTU) 來表示，並藉由分類後的操作分類單元和原始樣本數等量化數據來計算各種多樣性指標，例如 Chao 1 指標 (Chao1 index)、香農指標 (Shannon index) 及辛普森指標 (Simpson's index)，以此來評估環境中氨氧化古菌的多樣性。

Chao1 Index (bias-corrected Chao1) 通常用於評估族群數目也就是物種豐度 (Chao, 2005)，計算公式如下所示 (2-1)。而 Shannon index 和 Simpson's index 則是用於評估物種多樣性。Shannon's index (H') 是一個廣泛使用的多樣性指標，利用樣區中每個物種所占比例來進行多樣性估算，數值越高代表著此樣區多樣性越高，計算公式如下所示(2-2)。而 Simpson's index (D') 則會將樣本中豐度最高的物種，也就是樣區內的普遍物種進行加權，因此豐度較低的物種，也就是樣區內的稀少物種對這一指標的貢獻會較低。計算時 D' 範圍介於 0 到 1 之間，數值越大表示多樣性越低，因此

又另外有逆辛普森指標 (Inverse Simpson index) 被使用，這一指標為 Simpson index 的倒數，因此數值越大代表多樣性越高，計算公式如下所示 (2-3)。

Chao 1 Index (S)

$$S = D + f_1(f_1 - 1) / 2[2(f_2 + 1)]$$

D 為樣本中觀測到的物種數

f_1 為樣本中只出現一次的物種數

f_2 為樣本中只出現兩次的物種數 (2-1)

Shannon Index (H')

$$H' = \sum P_i \ln P_i$$

P_i 為各物種所佔總數量的比例 (2-2)

Simpson's Index (D')

$$D' = \sum P_i^2$$

Inverse Simpson index = $1 / D'$ (2-3)

2.7 分子生物檢測技術

微生物的研究除了以培養方式來進行外，近年來也有許多以非依賴培養 (culture-independent) 的方式來對微生物族群、豐度及多樣性等進行探討，而非依賴培養的方法是指利用分子生物檢測技術直接分析環境中的樣本，以此來省略在實驗室中培養微生物的步驟，近年來常用於微生物研究的分子生物技術主要包括了聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)、即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time polymerase chain reaction 又稱 qPCR)、變性梯度膠凝電泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、

限制性片段長度多態性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、螢光原位雜交 (fluorescent in situ hybridization, FISH) 及分子選殖 (Molecular cloning) 等。

2.7.1 聚合酶鏈鎖反應

聚合酶鏈鎖反應通常利用於擴增一段已知的片段基因，主要目標以某個特定基因或是某個基因的一小片段，一般來說不會超過 10kbp，擴增的片段則是由選擇的引物 (primer) 來決定，引物是人工合成的 DNA 片段，長度大小通常為 18~25bp，最大不會超過 50bp，使用時以成對的引物來進行，分別與擴增片段的起始區域和終止區域互補，當反應進行時引物與模板 DNA 的互補區結合，DNA 聚合酶再結合到此區域來進行新的 DNA 合成 (Fig 2-5)。

聚合酶鏈鎖反應在微生物生態的研究中已經是常見的一種方式，此方法不僅用於判別引子所針對的微生物的存在，在眾多的分生檢測過程中也是不可或缺的一環，例如可進行定量的即時聚合酶鏈鎖反應就是以此作為基礎而進一步發展出來的分析方式，變性梯度膠凝電泳的過程中也需要聚合酶鏈鎖反應的鎖擴增出來的基因片段，而分子選殖中利用的模板 DNA 同樣是藉由聚合酶鏈鎖反應來獲得，簡單來說，在調查微生物生態時為了專注在研究目標上，需要將目標放大並排除其他干擾，而聚合酶鏈鎖反應對於這一目的有很好的幫助，因此在目前的微生物生態研究中，所有利用到分生檢測方式的調查都幾乎免不了聚合酶鏈鎖反應這一過程。

2.7.2 即時聚合酶鏈鎖反應

即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time PCR) 又稱為定量 PCR (Quantitative PCR, q-PCR)，主要應用於細菌、病毒等數量監測上，這一方法主要是利用目標在進行擴增反應時加入螢光染劑，並監測其螢光強度在整個反應中的改變。反應所選用的螢光染劑可分為具有目標專一性和非專一性的兩種染劑，目標專一性的染劑通常是利用螢光探針或引子來進行結合 (Fig 2-6)，而目標專一性的則是與 DNA 進行結合的螢光染劑 (Fig 2-7)，常用的非專一性染劑主要有 Sybr Green，這一染劑會與雙股 DNA 結合並釋放螢光，因此在 PCR 反應進行中循環次數逐漸增加時，與 Sybr Green 結合的雙股 DNA 也同時增加，而偵測到的螢光強度也隨之增強，以此來將 DNA 進行量化分析。

而專一性的染劑以 TaqMan 為例，這種螢光染劑是選擇一段位於 PCR 引子間也就是目標基因的一個片段序列作為探針，在探針的 5'端標上螢光基團 (reporter)，另外在 3'端標上對應的淬滅基團 (quencher)，由於這兩個基團位置接近，可形成螢光能量的傳遞關係，因此不會有螢光訊號產生，而此探針因與模板 DNA 互補，所以在 PCR 進行時會與模板 DNA 結合，當引子合成到探針與模板 DNA 結合的位置時，探針的 5'端會被聚合酶所降解進而使兩個基團分離，此時螢光能量的傳遞關係消失，因此釋放出螢光訊號。

在整個反應過程中，理論上目標基因會以指數增長，但實際操作時由於模板 DNA 濃度、酶的活性等條件不同，反應需經過一定循環數螢光訊號才會開始進入指數增長，而螢光訊號開始指數增長時的循環數則是其 Ct 值 (Threshold Cycle)，Ct 值與起始反應的模板 DNA 數量呈反比，也就是說當起始的模板 DNA 越多時，整個反應也越快達到進入指數增長期的臨界點，Ct 值也相對來的小，反之當模板 DNA 較少時則需要更多循環數才能到達指數增長的臨界點。

在環境中的微生物生態探討中，即時聚合酶鏈鎖反應越來越常見，由於環境調查無法以實驗室培養中對微生物定量的方法來進行，例如最簡單的吸光值或是混合液懸浮固體濃度，以及化學分析基質濃度和產物濃度等方式，因此在研究中需要探討微生物數量時，從分子生物層面來進行定量的即時聚合酶鏈鎖反應就有其必要性，而目前對於氨氧化古菌的研究中，只要有涵蓋到豐度 (abundance) 的探討也幾乎是以即時聚合酶鏈鎖反應的方法來達成，而這也顯示出了此方法在微生物生態研究上的重要性。

2.8 生物統計

在微生物的生態研究裡，往往需要探討微生物和環境間的交互關係，其中需要各種的定量分析例如微生物的數量、種類和活性等等，當探討的層面廣泛或是進行深入研究時，通常會有多筆數據需要進行分析，因此，如何妥善的解讀實驗數據也是整個研究中重要的一環。而生物統計學是將統計學的原理和方法應用在生物學的研究上，利用統計學的收集、整理和歸納等方法來給出生物學上的正確訊息，早期常見於在醫學上的應用，近年也擴展到其他領域上，其中對於微生物生態研究上也有不小的貢獻，目前許多針對微生物的研究不管是實驗室培養或是野外調查，都經常可以看到利用生物統計的方式來分析其結果，以下將對本篇研究中主要利用到的統計分析方法詳細介紹。

2.8.1 相關係數 (Correlation coefficient)

相關分析在統計學中指的是分析隨機變量之間線性關係的強度和方向，其分析的結果依其測量尺度的不同而有各種的相關係數，其中皮爾森相關係數 (Pearson's correlation coefficient) 是一常見的相關係數，用來量測兩個變量 X 和 Y 之間的線性關係，從定義來看，其值範圍恆定於 +1 至 -1 之間，+1 表示 X 和 Y 兩個變量之間為完全的正相關性，也就是說所有的點

都分布在斜率為正的一條直線上，反之-1則是X和Y兩個變量之間為完全的負相關性，代表全部的點都分布在斜率為-1的直線上，而相關係數為0或非常接近0時，則代表X和Y兩個變量之間無相關性。另外需要注意的是，當變量間顯示無相關性存在時，不一定真的代表兩變量間完全沒有關聯，舉例來說，當變量間是周期性的關係時，相關係數的結果也會接近於0，因此在判別結果時需特別注意。

相關分析在氮氧化古菌的研究中是常見的方式，特別是在針對環境中的氮氧化族群調查上，相關係數可以快速的篩選出因子之間是否存在著關聯性。以土壤環境的氮氧化族群調查為例，通常會探討土壤中的氨氮、亞硝酸鹽氮以及硝酸鹽氮的濃度與氮氧化細菌和氮氧化古菌間物種豐度或物種多樣性的關聯性 (Stempfhuber *et al.*, 2014, Tripathi *et al.*, 2015)，更進一步會分析可代表氮氧化過程的指標性數據，並分析關聯性的強弱，來判別出此區域中主導氮氧化過程是氮氧化細菌還是氮氧化古菌。分析的項目會依照取樣環境或是調查目的的不同而改變，例如在海洋或河口環境時，部分文獻也探討了深度和鹽度對菌群豐度和多樣性的關聯性，另外也有探討特殊因子的研究，例如銅離子濃度、有機污染物 (Wang *et al.*, 2011)、重金屬濃度等 (Wang *et al.*, 2014)，以此分析因子對物種豐度或多樣性是正相關或是負相關，來判斷出檢測因子對於目標物種是促進還是抑制。

2.8.2 主成分分析 (Principal components analysis, PCA)

在微生物生態研究中，為了更好的了解微生物的特性、和環境的交互關係等等，需要同時探討許多因素，這些因素在統計分析中稱為變數，由於每個變數都可能包含了對於研究議題的必要訊息，同時各個變數間也可能有不同程度的關聯性，因此在變數太多時對於研究有一定的複雜性，而如何將涉及的變數減少並獲得最大的訊息量，是這類研究中一直探尋的，主成分分析則正是解決這些問題的理想方式。主成分分析是一種將數據簡

化並分析的方法，由 Karl Pearson 於 1901 年發明 (Pearson, 1901)，此方法可用於減少數據的維度，但保留了數據中對變異度貢獻最多的特徵，以此來將多變量轉變成少數幾個具代表性指標。主成分分析是一種線性轉換，把原有數據經由轉換投影至新的一個座標系統中，使總體數據最大變異在第一個座標上（主成分 1），第二大變異數在第二個座標上（主成分 2），以此類推，而越高階的主成分通常對數據的變異貢獻越低，因此會捨去高階主成分並保留低階主成分，以此來達成數據簡化的作用，同時也因為捨去的數據是對應元數據最小特徵值的成分，所以失去的資訊也應是最少的。

在氨氧化古菌的研究裡，主成分分析也有不少的應用，而那些使用了主成分分析的文獻中，有一部分是用來進行樣區相似度的分析 (Stempfhuber *et al.*, 2014)，另一部分是將檢測因子分類同時分析其關聯性強弱 (Gao *et al.*, 2013)。進行樣區分類的分析中，通常會進行多樣點的採樣，並檢測其各種環境特性，而這些量化後的數據進行主成分分析後，會使其投影至新的座標系統中，再將原本各樣點的數據帶入新的座標系統中可得到個別樣點於新座標上的位置，藉由這些樣點在新座標上位置的遠近和分布，即可判別出樣點間特性的相似程度。而在因子分類的部分，會著重在變量與變量間的關係，在新的座標軸上，原始數據的變量會轉變成新的一特徵向量 (eigenvectors)，而相關性越高的變量所夾角度也越小，因此可判斷出變量間的關係以及此關係的強弱程度。

2.8.3 稀疏曲線分析 (Rarefaction curve analysis)

稀疏曲線是一種評估方式，由於環境研究中有時無法確定樣本數是否有足夠數量代表現地生態情況，因此需要另行評估樣本數是否充足。而稀疏曲線圖是以物種數量和樣本數量來進行評估，當樣本數量增加時，物種數量增加趨勢逐漸平緩，則表示採集樣本數量已達合理數目，密集的採樣也無法增加太多觀測到的物種，但若樣本數量增加時，物種增加趨勢依舊陡峭，則表示物種還有很大一部份未被發現。稀疏曲線的計算公式如下(2-4)。

$$E(S) = \sum \left[1 - \left(\frac{N - N_i}{n} \right)^n \right]$$

N 為總樣本量

S 為物種數量

n 為用於比較的樣本量

N_i 為個別物種數量

(2-4)

第三章 材料與方法

3.1 實驗流程

本研究以河口底泥土樣為分析樣品，同時分析其土壤特性和氨氧化族群，來了解樣區中的各個環境因子和目標微生物族群間的關聯性，並以兩次採樣來大致評估微生物族群的穩定性。第一次採樣為整體調查，分析樣區中土壤特性及微生物族群，土壤特性包括 pH、含水率、潛在硝化速率 (Potential nitrification rate, PNR)、總有機碳 (Total organic carbon, TOC)、以及氨氮、亞硝酸鹽、硝酸鹽濃度等，微生物族群部分則為個別樣點的氨氧化古菌和氨氧化細菌定量，以及整體樣區的目標微生物定序，來瞭解氨氧化細菌和氨氧化古菌在各個樣點的數量，以及氨氧化古菌在此區域中的種類，最後以統計分析的方式來探討環境和微生物之間的關係，統計部分主要利用皮爾森相關係數分析和主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 來進行。第二次採樣為個別樣點的深入調查，同時與前一次採樣進行比較，來判別此區域環境和微生物的穩定性，土壤特性和微生物族群分析項目與整體調查相似，氨氧化古菌的種類調查以個別樣點來進行，並藉由稀疏分析 (Rarefaction) 來評估最終結果來判斷取樣是否足夠。本研究流程設計如 Fig 3-1 所示。

3.2 樣區描述

研究樣區為彰化濱海河口溼地，樣點選擇以主要的溪流或排水口為主要分佈於整個彰濱地區，樣點位置可參照 Fig 3-2，詳細位置之經緯度可參照 Table 3-1。此區域上游所排廢水包括了畜牧廢水、市政廢水以及工業廢水，從實驗室所參與的另一項生態環境監測計畫結果顯示 (行政院城鄉發展分署, 2015)，這些區域持續有氨氮排入，整體樣區呈低度到中度的氨氮污染，並且存在著濃度梯度，因此可預期此地區的氨氧化族群應受到氨氮濃度變化顯著的影響，而 pH 值以及其他檢測項目從以往的檢測並無顯現出

可預期的規律，因此可能的影響需後續分析來確認。而在第二次採樣時，則以地理位置考量，將整體樣區以 4 個區域進行劃分來進行，同時參照第一次的土樣特性進行樣點篩選，大致以存在著氨氮濃度梯度的樣點進行分析。

3.3 土樣採集

土壤第一次採樣於 2015 年 2 月，並預計為間隔時間 6 個月後再次採樣，但由於颱風及降雨等天候因素因此延到 10 月份採樣。2 月份採樣為全體 12 個樣點 (CH01 – CH12)，進行第一次總調查，族群調查也以整體樣區來進行分析，10 月份採樣則依照地理位置劃分，大致以四等份來區別，最後選擇採集 CH01、CH05、CH09 以及 CH12 這 4 個樣點來進行分析，同時深入進行個別樣點的族群調查。土樣取得是利用鑽土器在每一樣點採集 3 處具代表性土蕊 0~15 cm 表土，再將土樣先進行初步混和後裝入夾鏈袋中置於攜帶冰桶保持低溫，並於 24 小時內送回實驗室以 50 ml 離心管 (conical tube, BD Falcon™) 分裝保存直到後續分析。用於土樣特性分析的樣本 (含水率及潛在硝化速率除外)，先以 105°C 烘箱烘至恆重，土樣烘乾後將其搗碎並均質化，再以篩網 (20 mesh) 去除過大的顆粒和其餘雜質，之後保存於 4°C，於 48 小時內完成土壤特性分析。用於菌群分析的樣本保存於 -20°C，並於 48 小時內進 DNA 萃取。

3.4 土壤特性分析

3.4.1 pH

土壤 pH 值參考環檢所標準方法土壤酸鹼值測定方法—電極法 (NIEA S410.62C) 來進行。先秤取 20 g 烘乾並過篩後之土樣置於適當體積燒杯，分批加入試劑水 (本實驗室 DI Water: pH 8.41) 並利用磁石攪拌器混和，添加比例為 1:2.5 (土:水) 加入總體積 50 ml 試劑水，加入試劑水後持續攪

拌 5 分鐘，攪拌過程以鋁箔紙覆蓋，之後將其靜置約 1 小時使混和液大部分固體沉澱，再利用離心、過濾等方式取得水相層並記錄溫度，後測量水相層之 pH 值即為土樣之 pH 值。

3.4.2 含水率

土壤含水率檢測參考環檢所標準方法土壤及底泥水分含量測定方法—重量法 (NIEA S280.62C) 以及相關研究文獻 (Li *et al.*, 2015) 來進行，於過程中省略初步風乾步驟。首先取乾淨稱量盤置於烘箱中，以 $105 \pm 5^\circ\text{C}$ 乾燥 1 小時，後取出移至防潮箱中冷卻 45 分鐘，測定稱量盤之重量 (m_0) 並精秤至 10 mg，秤取約 10 至 15 g 之新鮮土樣置於稱量盤上，精秤含有土樣及稱量盤的重量 (m_1) 至 10 mg，將土樣和稱量盤放入烘箱中以 $105 \pm 5^\circ\text{C}$ 烘乾，每 4 個小時取出測重並記錄，前後兩次重量差距不超過 0.1% (m/m) 則視為恆重。大多數樣品乾燥時間需 16 小時至 24 小時，但某些特殊類型土壤可能需要較長時間。土樣達恆重後取出移至防潮箱中冷卻 45 分鐘，後取出稱量盤及土樣並秤重 (m_2)，結果處理以下列公式 (3-1) 計算土壤含水率。

$$\text{土壤含水率(\%)} : (m_2 - m_0 / m_1 - m_0) \times 100 \% \quad (3-1)$$

3.4.3 潛在硝化速率 (Potential nitrification rate, PNR)

潛在硝化速率測定參考相關研究文獻 (Chen *et al.*, 2013) 和環檢所標準方法水中亞硝酸鹽氮檢測方法—比色法 (NIEA W418.51C) 來進行，為了盡量貼近現地狀況，須於採樣後盡快測定以確保樣本中微生物活性。檢測過程如下，先取乾淨的 50 ml 離心管秤重，後加入新鮮土樣至離心管中，藉由扣除離心管重量後秤得 5 g 土樣，再加入 PBS buffer (Table 3-2) 與 1mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，最後加入最終濃度 10mM KClO_3 ，以此來對硝酸菌群

(Nitrite - oxidizing bacteria, NOB) 進行抑制，使整體硝化過程停留在亞硝酸鹽的部分。試劑添加後靜置於黑暗中室溫培養 24 小時，培養後再加入 5 ml 2M KCl 混和，並置於往復式震盪器上，以 200 rpm 震盪 1 小時，充分混和後以 3000 rpm 離心 10 分鐘取得上層液，之後參照環檢所標準方法來檢測液體中亞硝酸鹽濃度，換算後求得潛在硝化速率($\text{NO}_2^- \text{ mg/kg soil/d}$)。

3.4.4 總有機碳

土壤總有機碳測定委由東海大學土壤化學實驗室檢測，並於中興大學土環系分析，分析過程參考農試所檢測方式土壤有機質測定方法—燃燒紅外線測定法 (TARI S201.1B) 並依照實驗室情形而做調整，檢測方式利用土壤樣本於 800°C 燃燒時，有機碳會裂解而產生二氧化碳和水，這些二氧化碳經由載流氣體輸送至紅外線分析儀時，可測得土壤中碳濃度，但由於土樣中無機碳也會經由裂解而產生二氧化碳，因此檢測前須經由酸化反應 12 小時來對土樣進行前處理，此時土樣中的碳酸鹽類等無機碳會被轉化成二氧化碳，在進行裂解後即可由二氧化碳濃度來測得有機碳濃度。

檢測時取 0.5 g 經過烘乾過篩等前處理後的土樣，加入 1 ml 10% H_3PO_4 後，使其反應 12 小時，反應結束後置於 105°C 烘箱去除樣本中多餘水分，再利用多功能分析儀 (multi N/C 2100, Analytik Jena, Germany) 分析樣本燃燒時所產生的二氧化碳濃度，檢量線利用鄰苯二甲酸氫鉀 (Potassium hydrogen phthalate) 製備，將土樣所測得之二氧化碳濃度帶回檢量線後求得樣本中的有機碳濃度。

3.4.5 鹽度

土壤鹽度檢測參考農試所檢測方式土壤電導度測定方法 (TARI S101.1B) 測得電導度後，再參考環檢所標準方法水中鹽度檢測方法—導電度法 (NIEA W447.20C) 換算求得土壤鹽度。檢測步驟如下，秤取 10 g 經

前處理烘乾過篩後土樣置於 250 ml 三角錐形瓶中，加入 50 ml 試劑水並以往復式震盪機 140 rpm 震盪 1 小時，經震盪後之水土混和溶液以 3000 rpm 離心 10 分鐘取得上層液，再以手提式電導度計（SC-110, Suntex, Taiwan）測其電導度，即為土樣之電導度。電導度計使用前須以 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 校正液進行校正，每個樣品測定後需將電極以去離子水清洗乾淨，才可進行下一樣品測試。測得土樣之導電度後再利用環檢所標準方法中所提公式進行換算，即可求得土壤鹽度，換算公式如式 3-2。

$$S(\text{鹽度}) = a_0 + a_1R_t^{1/2} + a_2R_t + a_3R_t^{3/2} + a_4R_t^2 + a_5R_t^{5/2} + \Delta S \quad (3-2)$$

$$\Delta S = [(t - 15)/1 + 0.0162(t - 15)](b_0 + b_1R_t^{1/2} + b_2R_t + b_3R_t^{3/2} + b_4R_t^2 + b_5R_t^{5/2})$$

$$\begin{aligned} a_0 &= 0.0080 & b_0 &= 0.0005 \\ a_1 &= -0.1692 & b_1 &= -0.0056 \\ a_2 &= 25.3851 & b_2 &= -0.0066 \\ a_3 &= 14.0941 & b_3 &= -0.0375 \\ a_4 &= -7.0261 & b_4 &= 0.0636 \\ a_5 &= 2.7081 & b_5 &= -0.0144 \end{aligned}$$

$R_t = C$ （水樣於一大氣壓、 t $^{\circ}\text{C}$ 之條件下）/ C （32.4356 克/公斤 KCl 溶液於一大氣壓、 t $^{\circ}\text{C}$ 之條件下）

C = 導電度

3.4.6 氮氮

土壤氮氮的分析過程首先參考研究文獻（Chen *et al.*, 2013）進行萃取。精秤風乾過篩後土樣 5 g 加入乾淨離心管中，再加入 25 ml 的 2M KCl（土比水為 1:5），置於往復式震盪器上以 200 rpm 震盪 1 小時，再以 3000 rpm 離心 10 分鐘取得上層液，之後以玻璃纖維濾膜（Grade GF/C, Whatman, England）進行過濾（1.2 μm ），至此即完成萃取步驟。而氮氮檢測部分則參照研究文獻（Bollmann *et al.*, 2011）的方法來進行，先取 2 ml 萃取液加入

試管中，另加入 1ml 硝普鈉 (sodium nitroprusside) 試劑和氫氧化鈉的 1:2 混和試劑 (Table 3-3) 混和均勻 (vortex)，再加入 0.4 ml 濃度 0.2g/L 的二氯異氰尿酸鈉 (sodium dichloroisocyanurate) 水溶液並再次混和均勻，之後靜置於暗處 30 分鐘呈色。在硝普鈉存在下，銨離子會與水楊酸 (sodium salicylate) 以及次氯酸離子反應生成藍色化合物，因此可利用分光光度計 (UV mini -1240, Shimadzu, Japan) 於波長 660 nm 下測定其吸光度，此呈色最少可穩定 8 小時，之後將吸光值帶回檢量線後求得氮氮濃度。此方法偵測極限約為 0.05 mg/L。

3.4.7 亞硝酸鹽氮

土壤亞硝酸鹽氮的檢測方法先經過土樣萃取後再參照環檢所標準方法 NIEA W418.51C 來進行。磺胺 (sulfanilamide) 在酸性條件下 (pH 2.0–2.5) 會與水中亞硝酸鹽產生偶氮化反應 (diazotation) 形成偶氮化合物，而這一偶氮化合物會再與 N-1-萘基乙烯二胺二鹽酸鹽 (N - (1- naphthyl) - ethylenediamine dihydrochloride) 偶合而形成紫紅色偶氮化合物，此化合物可用分光光度計於 543 nm 波長下測得吸光值，對照算出亞硝酸鹽氮的濃度。此方法偵測極限約為 0.01 mg/L。

分析時依照標準方法所示之樣本體積等比縮減，取萃取後之樣本 1 ml 加入 15 ml 試管中，添加 0.04 ml 呈色試劑 (Table 3-4) 並以試管震盪器混和均勻，再以鋁箔紙包覆試管及管口並置於陰暗處使其呈色，反應約半個小時完成，呈色後利用分光光度計檢測其吸光值並記錄，此呈色可穩定維持約 2 個小時，因此分析應於這段時間中完成。檢量線依相同方式製作，之後將吸光值帶回檢量線回算樣本中亞硝酸鹽濃度。

3.4.8 硝酸鹽氮

土壤硝酸鹽氮的檢測方法先經過土樣萃取後再參照環檢所標準方法

NIEA W419.51A 來進行。水溶性有機物以及硝酸鹽於 220 nm 波長下有吸光現象存在，而波長於 275 nm 時有機物還存在著吸光反應，但硝酸鹽則不存在吸光反應，因此可利用此特性來測得樣本中硝酸鹽濃度，先測得樣本於 220 nm 波長下的吸光值後，再扣掉 2 倍 275 nm 波長下的吸光值，即可求得樣本中硝酸鹽的濃度。須注意，溶解性有機物干擾之校正值（275 nm 處之兩倍吸光度）不可大於 220 nm 處吸光度的 10 %。

分析時依照標準方法所示之樣本體積等比縮減，取萃取後之樣本 1 ml 加入 15 ml 試管中，添加 0.02 ml 1 M 鹽酸溶液並以試管震盪器混和均勻，再以鋁箔紙包覆試管及管口並置於陰暗處使其反應，反應約半個小時後以分光光度計於 220 nm 及 275 nm 波長下測定吸光值並記錄，檢量線依相同方式製作，之後將吸光值帶回檢量線回算樣本中硝酸鹽濃度。此方法偵測極限約為 0.05 mg/L。

3.5 分子生物檢測

3.5.1 DNA 萃取

土樣 DNA 萃取是利用商用核酸萃取試劑組 (PowerSoil[®] DNA Isolation Kit, Mo Bio) 並參照其操作手冊來進行。先取 0.25 g 土樣加入 PowerBead Tubes，加入後溫和的 vortex 使其混和，管中所含緩衝溶液可溶解土壤中腐植酸，以及避免核酸降解，同時有助於土壤顆粒散開。混和後加入 60 μ l C1 溶液並反轉 Bead Tube 數次使其混和，C1 溶液使用前須注意有無沉澱，由於此溶液中包含十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 以及其他用於裂解細胞的試劑，當此試劑遇冷時，可能會於底部形成白色沉澱，此時可加熱至 60 $^{\circ}$ C 使其溶解，此加熱動作不會破壞 SDS 和其他試劑，且 C1 溶液於 60 $^{\circ}$ C 時也可正常使用。加藥後將 Bead Tube 蓋子旋緊，再水平固定於震盪器上，以最高速震盪 10 分鐘，震盪後取下 Bead Tube 再利用高速離心機以 10,000 x g 進行離心 30 秒鐘，之後將全部上清液取出並加到一個乾

淨的 2 ml Collection Tube，再加入 250 μ l C2 溶液並溫和震盪 5 秒鐘，混和後放置於 4°C 冰箱 5 分鐘，C2 溶液作用為抑制因子去除，其中的試劑可將非 DNA 的有機物和無機物沉澱，包括腐殖質、細胞碎片和蛋白質等，這些雜質有可能會使得 DNA 純度下降，以及對後續 DNA 應用分析造成干擾。反應後，利用高速離心機以 10,000 x g 離心 1 分鐘，之後取 600 μ l 上清液轉移至新的 2 ml Collection Tube，要注意避免取到底部沉澱物，再加入 200 μ l C3 溶液並溫和震盪 5 秒鐘，混和後放置於 4°C 冰箱 5 分鐘，此步驟為第 2 次抑制因子去除。

之後以高速離心機於 10,000 x g 下離心 1 分鐘，再取 750 μ l 上清液至新的 2 ml Collection Tube，同樣避免取到底部沉澱物，再加入 1.2 ml C4 溶液，並於使用前搖晃混和均勻，加入時須注意勿超過管口，C4 溶液為高濃度鹽溶液，由於 DNA 在高鹽濃度下會與二氧化矽緊密結合，因此加入此溶液會使 DNA 可以結合二氧化矽，而使其他非 DNA 的有機物和無機物通過後續使用的濾器。混和均勻後取約 675 μ l 加入 Spin Filter 並以高速離心機於 10,000 x g 下離心 1 分鐘，之後丟棄濾液再加入 675 μ l 重複離心步驟，再將剩餘溶液加入並重複步驟，把全部溶液通過 Spin Filter，此時 DNA 由於高鹽濃度會被結合在二氧化矽濾膜上，而其餘雜質則通過濾膜存在於濾液中。加入 500 μ l C5 溶液於 Spin Filter 中並以高速離心機於 10,000 x g 離心 30 秒鐘，C5 溶液為清洗溶液，主要為乙醇，此溶液用於清洗結合於 Spin Filter 中二氧化矽濾膜上的 DNA，並去除殘留的鹽、腐殖酸和其他污染物。離心後倒棄濾液並再次以 10,000 x g 離心 1 分鐘，此步驟為確保 C5 溶液完全去除，因溶液中主要為乙醇，若在 DNA 樣本中有部分殘留，可能會影響後續的分析程序，如聚合酶鏈鎖反應和膠凝電泳等。完全去除殘留溶液後，將 Spin Filter 轉移到一乾淨的 2 ml Collection Tube，再加入 100 μ l C6 溶液於中心濾膜上，由於 C6 溶液中缺少鹽分，結合於二氧化矽濾膜上的 DNA 也因為 C6 溶液中所含的三羥甲基氨基甲烷 (Tris (hydroxymethyl))

aminomethane, Tris) 而提高溶解性，因此結合的 DNA 被 C6 溶液所溶出。再經由高速離心機以 10,000 x g 離心 30 秒鐘後丟棄 Spin Filter，即可獲得萃取的 DNA，樣本保存可置於 -20 至 -80°C 進行長期保存。DNA 濃度及純度以 Nanodrop spectrophotometer (Maestro Nano Drop, Green BioResearch, USA) 測定於 230 nm、260 nm 以及 280 nm 波長下的吸光值進行分析。

3.5.2 膠凝電泳

膠凝電泳一般可用於簡單的 DNA 確認或是分離不同長度的 DNA 片段，由於洋菜膠 (Agarose) 在凝固之後具有多孔洞的特性，因此可藉由此特性來使不同分子量的物質有效分離，針對不同長度的 DNA 片段，可以利用不同濃度 (Table 3-5) 的洋菜膠來達到更理想的效果 (Sambrook and Russell, 2001)。配置膠體時於三角錐形瓶中加入選擇濃度所需的洋菜膠，再加入 TAE Buffer，溶液所用體積依照使用槽體大小而異，配置完後加熱使其溶解，再倒入製膠台中同時將膠片齒模 (comb) 裝上，膠體冷卻約 15 分鐘後凝固，將膠片取出置於電泳槽中，並於電泳槽中倒入 TAE Buffer 使其剛好沒過膠片槽 (well)，再將 DNA 樣本以及標準品 (DNA ladder) 分別與 6x loading dye 以 5:1 (v/v) 混和後注入膠片槽中，以 50 V 電壓進行電泳，過程中可依照染劑位置來調整電泳時間，實驗約需 30 分鐘來進行。電泳結束後，取出膠片置於溴化乙錠 (Ethidium bromid, EtBr) 溶液 (0.5 µg/ml) 中進行染色，染色 10 分鐘後浸泡 DI Water 中退染 5 分鐘，之後取出至於 UV 照膠系統 (Vilber Lourmat) 中進行觀察。

3.5.3 聚合酶鏈鎖反應

本研究所選擇引子是針對氨氧化細菌和氨氧化古菌的特殊功能性基因 *amoA* 基因為目標所設計 (Table 3-6)，針對細菌的引子為 *amoA*-1F/*amoA*-2R (Rotthauwe et al. 1997)，擴增產物片段約為 450 bp。針對古菌的引子為

amoAF/amoAR (Francis et al., 2005), 擴增產物片段約為 635 bp。進行反應時, 以混和試劑 (GoTaq Green Master Mix, Promega, USA)、引子和模板 DNA 依照適當比例添加 (Table 3-7), 並利用聚合酶鏈鎖反應器 (MyCycler™ Thermal Cycler, Bio-Rad, USA) 進行溫度循環反應 (Table 3-8), 各階段溫度參照文獻所用溫度並利用梯度溫度來找出最佳溫度條件, 完成聚合酶鏈鎖反應後, 再次進行膠凝電泳來分析產物, 以此確認是否為目標片段。

3.5.4 分子選殖

分子選殖 (Molecular cloning) 是為了下列目的而進行, 其一是作為即時聚合酶鏈鎖反應的標準品製備, 這部分會於後續進行詳細說明, 其二則是為了取得樣點中氨氧化古菌族群的片段基因序列, 希望能獲得乾淨且隨機的目標片段來進行後續分析。為了達成目標, 樣本經由 DNA 萃取後, 經由前述的過程確認純度等條件後, 利用針對古菌的 *amoA* 基因引子進行擴增反應, 並以此擴增後產物作為選殖用的模板 DNA 進行分子選殖。本實驗利用選殖試劑組 (T&A™ Cloning Kit, YEASTERN, Taiwan) 來進行, 使用載體為 T&A™ Cloning vector (2728 bp), 選用的勝任細胞為 E.Coli DH5α (ECOS™ 101 Competent Cells, YEASTERN, Taiwan)。

實驗流程可分為兩個部分, 連接反應 (ligation) 以及質體轉形 (transformation), 進行連接反應時, 將模板 DNA 以 2μl 加入, 並參照操作手冊加入所需的連接緩衝溶液、T&A™載體以及 *yT4* DNA 連接酶 (Table 3-9), 之後靜置於室溫中 5 至 15 分鐘使其反應, 若需要更好的連轉形效率, 可置於 4°C 冰箱隔夜。反應中模板 DNA 3'端的基因末端上會加上一個腺嘌呤 (Adenine, A), 因此藉由 DNA 連接酶與載體 DNA 缺口兩端的胸腺嘧啶 (Thymine, T) 互補, 形成完整的質體 DNA (plasmid)。此方法由於連接時並不存在方向性, 因此模板 DNA 有一半的機率會以反方向的形式

被植入載體中，因此於後續分析時須注意此情況。

質體 DNA 製備完成後，接著進行質體轉形，取出冷凍的勝任細胞後先以室溫自來水解凍，解凍至勝任細胞約一半溶解後置於冰上，再加入預冷的質體 DNA 5 μ l 後，反轉反應管數次使其混和均於，再靜置於冰上 5 分鐘，之後利用恆溫水浴槽 42 $^{\circ}$ C 水浴 45 秒鐘進行熱休克 (heat-shocked)，過後將其塗盤於培養基上，並隔夜培養於 37 $^{\circ}$ C。培養基參照手冊所述 (Table 3-10)，配置含有抗生素氨苄青黴素 (ampicillin) 的 LB 固態培養基 (lysogeny broth)，加入抗生素前由於培養基經過高溫高壓滅菌，因此須待其降溫至約 55 $^{\circ}$ C 才可加入。藍白篩試劑可事先配置，取 IPTG 溶液 40 μ l (0.5 mM) 和 X-gal 溶液 10 μ l (40 μ g/ml) 預先混和後，均勻塗抹於 LB 固態培養基上，再放置於無菌操作台內，將培養皿蓋半蓋於培養皿上，由於 X-gal 溶液中的溶劑為二甲基甲醯胺 (Dimethylformamide, DMF)，對生物具有毒性，因此將培養基置於操作台使其揮發。

因載體 DNA 上存在著一段抗生素耐受基因 (ampicillin resistance gene, Amp^r)，所以載體 DNA 與模板 DNA 結合成完整質體後，若勝任細胞接收了此外源 DNA 則可擁有對抗生素的耐受性，因此在培養基上的可見菌落即表示含有此質體，而這部份則為第一階段的篩選。第二階段的篩選是由於實驗中存在了一些不確定性，有時載體 DNA 會在沒有嵌入模板 DNA 的情況下形成質體，而在此情況下勝任細胞同樣可擁有對抗生素的耐受性，因此利用藍白篩來進一步篩選。藍白篩是利用將載體 DNA 切點設計於其中的 β -半乳糖苷酶基因上 (Fig 3-3, Fig 3-4)，當模板 DNA 連接到此載體 DNA 上時，會使其產生不具功能性的 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase)，因此不會與 X-gal 產生反應，在培養皿上會形成白色菌落。但載體 DNA 上的 β -半乳糖苷酶基因不存在外來 DNA 時，則會產生具功能性的 β -半乳糖苷酶，經由 IPTG 誘導其活性後，會轉化 X-gal 這一模擬乳糖，最後形成 5,5'-二溴-4,4'-二氯靛 (5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo) 這一藍色物質，因此

會在培養皿上形成藍色菌落。

經過 16 小時培養後，於無菌操作台進行挑菌，挑菌時選取白色菌落且避免取到藍色菌落，利用接種環或是滅菌後牙籤刮取菌體，以 T&A™ Cloning Kit 內含 primer 以及 GoTaq Green Master Mix 直接進行菌落 PCR (Colony PCR) 確認，反應試劑及反應溫度參照手冊進行 (Table 3-11, Table 3-12)，同時將菌體轉殖至乾淨離心管中進行液態培養，待菌落 PCR 結果確認後，於液態培養 12 小時即可送交定序，定序引子使用 M13-F。本研究由於主要目標為氨氧化古菌的族群調查，因此分子選殖後用於定序的樣本只有針對氨氧化古菌的功能性基因，用於定序的樣本中，2 月樣本以整體樣區為主，並挑選 50 個白色菌落送交定序，10 月樣本則以個別樣點為主，每樣點挑選 20 個白色菌落送交定序。

3.5.5 即時聚合酶鏈鎖反應

即時聚合酶鏈鎖反應用於樣本中的氨氧化古菌和氨氧化細菌基因定量，來確認其在樣本中的豐度 (abundance)，檢測所用儀器為即時聚合酶鏈鎖反應儀 (StepOne™ Real-Time PCR System, Thermo Fisher, USA)，選用的螢光染劑為 Sybr Green (GM SYBR qPCR Kit, GeneMark, Taiwan)。

檢量線於樣本檢測前繪製，標準品利用分子選殖方式製備，將含有目標基因的菌落轉移至液態培養後，培養 16 小時，再以試劑組 (Gene-Spin™ MiniPrep Plasmid Purification Kit, Protech, Taiwan) 萃取質體 DNA，獲得的質體 DNA 經過超微量分光光度計 (Maestro Nano Drop, Green BioResearch, USA) 檢測濃度和純度，之後藉由下述公式 (3-4) 從樣本濃度 (ng/μl) 算出基因拷貝數 (copies/μl)，再將樣本稀釋成分析用標準品，連續稀釋後檢量線取 1×10^9 、 1×10^7 、 1×10^5 、 1×10^3 、 1×10^2 以及 1×10^1 copies/μl 來進行，反應試劑 (Table 3-13) 與反應條件 (Table 3-14) 參照操作手冊及文獻設置。樣本檢測依照檢量線之相同條件進行，樣本與檢量線反應皆以三

重複進行。

$$\text{DNA 拷貝數}(\text{copies}/\mu\text{l}) = \text{DNA 莫爾濃度}(\text{mol}/\mu\text{l}) \times (6.02 \times 10^{23})$$

$$\text{DNA 莫爾濃度}(\text{mol}/\mu\text{l}) = \text{DNA 濃度}(\text{g}/\mu\text{l}) / \text{DNA 總分子量}(\text{g}/\text{mol})$$

$$\text{DNA 總分子量}(\text{g}/\text{mol}) = \text{DNA 片段長度}(\text{bp}) \times 660(\text{g}/\text{mol}/\text{bp})$$

* 6.02×10^{23} 為亞佛加厥常數

* $660(\text{g}/\text{mol}/\text{bp})$ 為鹼基對平均分子量 (3-4)

3.5.6 序列分析

樣本定序委託明欣生物技術科技有限公司，利用 M13-F 引子進行單向定序，獲取的序列檔案匯入 MEGA 6 中進行分析，先確認序列訊號強度，一般而言序列兩端訊號較為雜亂，而其餘部分應為鹼基訊號較強區域，若目標基因位置的鹼基訊號為單一波峰而無其他鹼基訊號則為乾淨且可用之序列，反之，則須視情況來判斷，可能會需要捨棄此段序列。初步篩選後再以古菌 *amoA* 基因引子序列進行確認，判別序列是否含有目標基因片段，利用正、反股引子序列找到目標基因序列後，刪去其餘質體 DNA 序列，即可獲得完整目標基因序列。由於基因插入時不存在方向性，因此在篩選時可能會需要反轉序列來搜尋引子序列。獲得完整序列後，將其排列對齊 (alignment)，若發現序列中存在間隙 (gap)，視其長度而定，若間隙過大則表示序列不完整，需捨棄此段序列，反之則可保留，並於後續分析時將其他序列的相同區域刪去來比較共同的區塊。序列分析完成後，利用 MEGA 6 將序列以相似度為判別基準，97 % 以上的序列相似度劃分為同一個操作分類單元 (OTU)。

3.5.7 親緣分析

序列分析完成後，以個別的完整序列至美國國家生物技術信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的基因資料庫 (GeneBank) 利用局部對比工具 (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) 進行比對，來獲得最相近序列，以此作為已知文獻的對照序列，之後以樣本序列以及文獻序列來繪製親緣樹狀圖 (phylogenetic tree)，統計方式選用最大似然法 (maximum likelihood)，系統發育檢測選擇自助抽樣法 (Bootstrap Method) 來進行抽樣檢測，抽樣次數為 500 次。

3.6 統計分析

統計部分主要利用相關係數分析以及主成分分析來探討 2 月樣本中環境因子與物種豐度間的關聯性以及樣點間特性上的差異，而 10 月採樣由於只針對 4 處樣點進行深入調查，所以沒有足夠的樣本數進行上述統計分析，因此只針對物種多樣性部份另外進行稀疏曲線分析 (rarefaction curve)，對樣本數與物種數增加的趨勢進行估計，來檢測取樣數是否足夠。

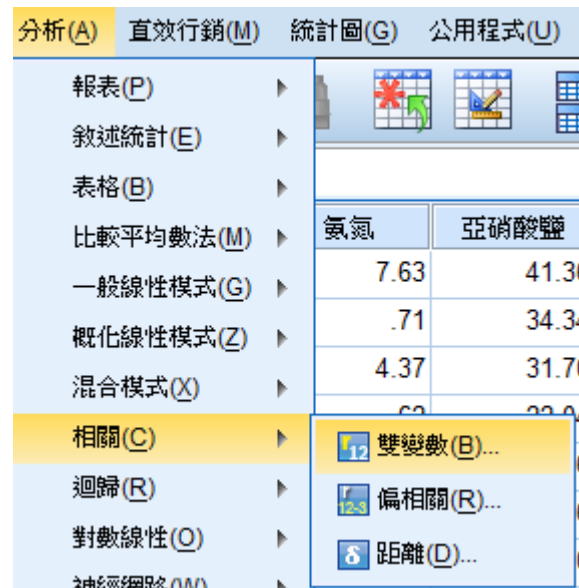
相關係數分析利用統計軟體 SPSS 進行計算，相關係數的顯著性以雙尾檢定進行，顯著水平在 0.05 時為顯著相關，顯著水平在 0.01 時為高度顯著相關。SPSS 的操作步驟如下。

1. 先將原始數據輸入 SPSS 中

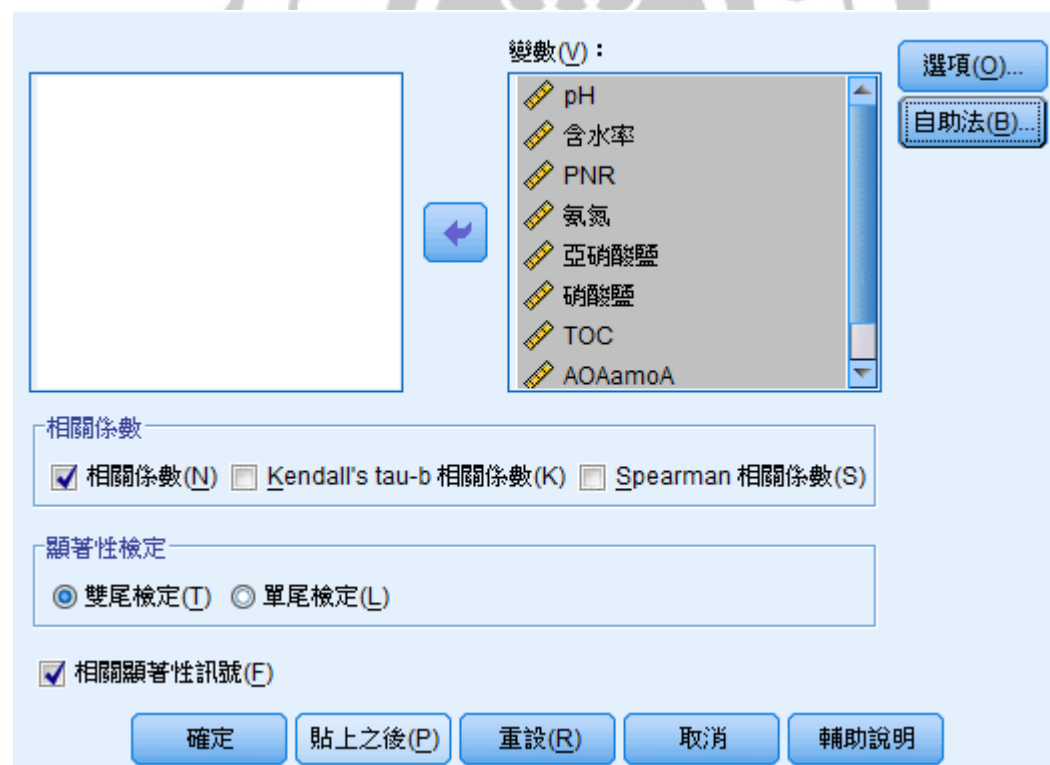


	樣點	pH	含水率	PNR	氨氮	亞硝酸鹽	硝酸鹽	TOC	AOAamoA	AOBamoA
1	CH01	7.51	.19	.78	7.63	41.36	1.87	3.22	6.65	8.55
2	CH02	8.02	.21	.29	.71	34.34	4.47	2.69	5.05	4.40
3	CH03	8.33	.19	1.21	4.37	31.70	2.90	1.74	6.85	4.62
4	CH04	7.49	.38	.22	.62	22.04	6.28	6.86	5.47	5.06
5	CH05	7.78	.39	.38	.18	21.16	4.54	6.41	5.43	3.78
6	CH06	7.86	.38	.41	.27	13.26	7.29	2.57	5.74	3.20
7	CH07	7.81	.23	.24	1.92	31.70	2.90	2.90	5.43	4.10
8	CH08	8.26	.26	.34	.43	29.95	3.87	13.16	6.37	2.70
9	CH09	8.36	.31	.18	2.43	32.58	1.82	1.14	6.14	3.20
10	CH10	8.32	.28	.31	4.09	31.70	1.44	3.75	5.45	5.21
11	CH11	8.01	.35	.39	2.28	34.34	1.50	4.44	5.79	7.10
12	CH12	8.62	.29	.49	4.29	64.19	1.15	2.20	5.99	5.48

2.選擇分析中的相關分析，並選擇雙變數選項



3.選擇要分析的變數，其他選項若無特別需求則無需更動，設定完後按確認則開始分析



4.分析完成後會輸出另一新文件，可擷取數據重新編排以利閱覽

IBM SPSS Statistics Viewer

[0001] D:\Kiva\000\0000\soil sample.sav

相關

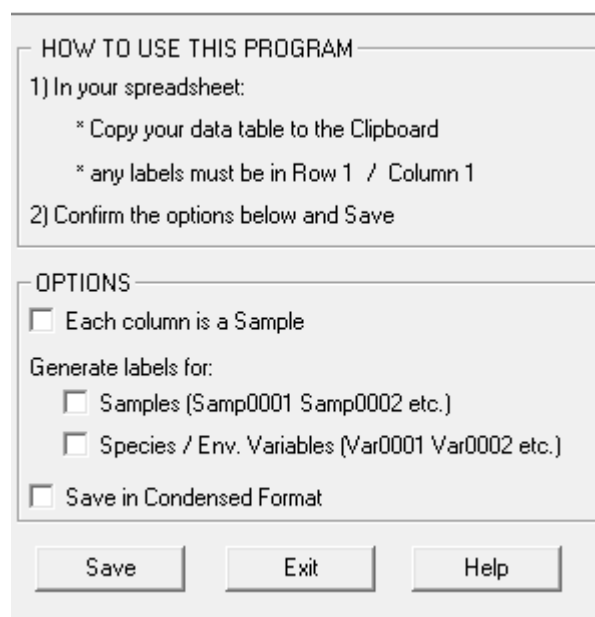
		pH	含水率	PNR	氨氮	亞硝酸鹽	硝酸鹽	TOC	AOAamoA	AOBamoA
pH	Pearson 相關	1	-.197	.108	.116	.513	-.516	-.148	.231	-.303
	顯著性 (雙尾)		.540	.737	.719	.088	.086	.646	.470	.338
	個數	12	12	12	12	12	12	12	12	12
含水率	Pearson 相關	-.197	1	-.503	-.584	-.442	.445	.202	-.413	-.246
	顯著性 (雙尾)	.540		.096	.046	.150	.147	.529	.183	.440
	個數	12	12	12	12	12	12	12	12	12
PNR	Pearson 相關	.108	-.503	1	.592	.193	-.186	-.244	.738	.350
	顯著性 (雙尾)	.737	.096		.043	.548	.562	.445	.006	.265
	個數	12	12	12	12	12	12	12	12	12
氨氮	Pearson 相關	.116	-.584	.592	1	.609	-.694	-.427	.589	.739
	顯著性 (雙尾)	.719	.046	.043		.036	.012	.166	.044	.006
	個數	12	12	12	12	12	12	12	12	12
亞硝酸鹽	Pearson 相關	.513	-.442	.193	.609	1	-.743	-.256	.257	.448
	顯著性 (雙尾)	.088	.150	.548	.036		.006	.422	.420	.144
	個數	12	12	12	12	12	12	12	12	12
硝酸鹽	Pearson 相關	-.516	.445	-.186	-.694	-.743	1	.271	-.330	-.473
	顯著性 (雙尾)	.086	.147	.562	.012	.006		.394	.294	.120
	個數	12	12	12	12	12	12	12	12	12
TOC	Pearson 相關	-.148	.202	-.244	-.427	-.256	.271	1	.020	-.255
	顯著性 (雙尾)	.646	.529	.445	.166	.422	.394		.951	.424
	個數	12	12	12	12	12	12	12	12	12
AOAamoA	Pearson 相關	.231	-.413	.738	.589	.257	-.330	.020	1	.214
	顯著性 (雙尾)	.470	.183	.006	.044	.420	.294	.951		.505
	個數									

主成分分析以統計分析軟體 canoco 4.5 進行計算，將原始數據進行重新量尺化後，以共變異矩陣 (Covariance matrix) 取得具最大變異數的主成分後，繪製主成分分析的成分圖。

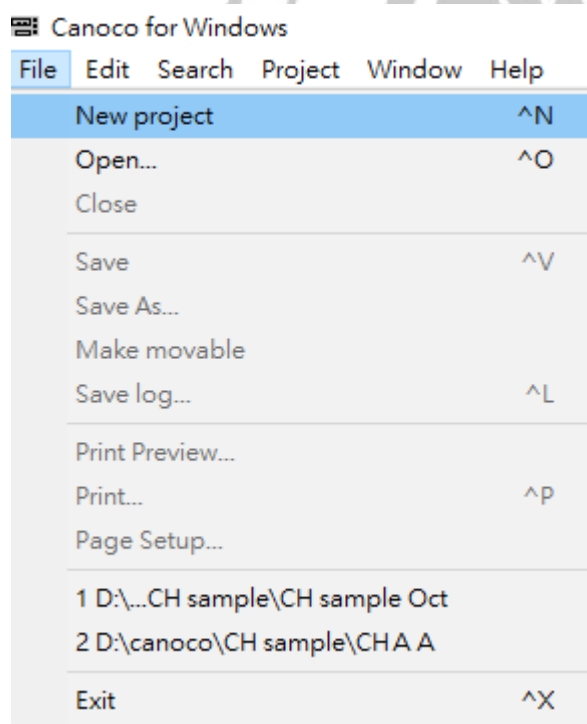
1. 首先將原始數據以 excel 格式輸入，並選取整體數據後反白複製

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1		pH	water	PNR	Ammonium	Nitrite	Nirtate	TOC	AOA	AOB
2	1	7.51	19.09	0.78	15.25	82.72	3.73	3.22	6.65	8.55
3	2	8.02	20.95	0.29	1.41	68.67	8.94	2.69	5.05	4.40
4	3	8.33	19.20	1.21	8.73	63.40	5.80	1.74	6.85	4.62
5	4	7.49	38.48	0.22	1.23	44.08	12.55	6.86	5.47	5.06
6	5	7.78	38.58	0.38	0.36	42.33	9.08	6.41	5.43	3.78
7	6	7.86	38.11	0.41	0.54	26.52	14.58	2.57	5.74	3.20
8	7	7.81	23.18	0.24	3.84	63.40	5.80	2.90	5.43	4.10
9	8	8.26	25.99	0.34	0.87	59.89	7.74	13.16	6.37	2.70
10	9	8.36	30.74	0.18	4.85	65.16	3.65	1.14	6.14	3.20
11	10	8.32	28.16	0.31	8.19	63.40	2.89	3.75	5.45	5.21
12	11	8.01	34.91	0.39	4.57	68.67	3.01	4.44	5.79	7.10
13	12	8.62	28.52	0.49	8.59	128.39	2.31	2.20	5.99	5.48

2.點選 canoco 4.5 文件檔案中的 WCanImp，將上一步驟所選取複製的數據進行格式轉換，選項中若已將各項數據定義則無需更動，完成後點選 Save 另存檔案



3.之後選擇 canowin 進入分析程式，並點選 File 下的 New project



4.在 data available for analysis 下選擇 only species data available 並選擇下一步

DATA AVAILABLE FOR ANALYSIS

Only species data available

Species and environment data available

Species, environment and covariable data available

Species and covariable data available

Supplementary environment data available

ENVIRONMENTAL DATA, WHEN AVAILABLE, SHOULD BE USED TO:

extract patterns from the explained variation only (direct gradient analysis)

interpret patterns extracted from all variation (indirect gradient analysis)

< 上一步(B) 下一步(N) > 取消 說明

5.在檔案選擇的步驟選取之前轉換格式的.dta 檔案，並在最下方命名此次運算結果的檔名，完成後點選下一步

Species data file name:
D:\canoco\CH sample\CH sample data.dta Browse

Environment data file name: Browse

Covariables data file name: Browse

Supplementary environment data file name: Browse

Canoco solution file name:
CH sample analysis Browse

< 上一步(B) 下一步(N) > 取消 說明

6.分析類型處選擇 PCA

Response Models	Gradient Analysis Methods		
	Indirect	Direct	Hybrid
Linear	<input checked="" type="radio"/> PCA	<input type="radio"/> RDA	<input type="radio"/> hRDA
Unimodal	<input type="radio"/> CA	<input type="radio"/> CCA	<input type="radio"/> hCCA
Unimodal (detrended)	<input type="radio"/> DCA	<input type="radio"/> DCCA	<input type="radio"/> hDCCA

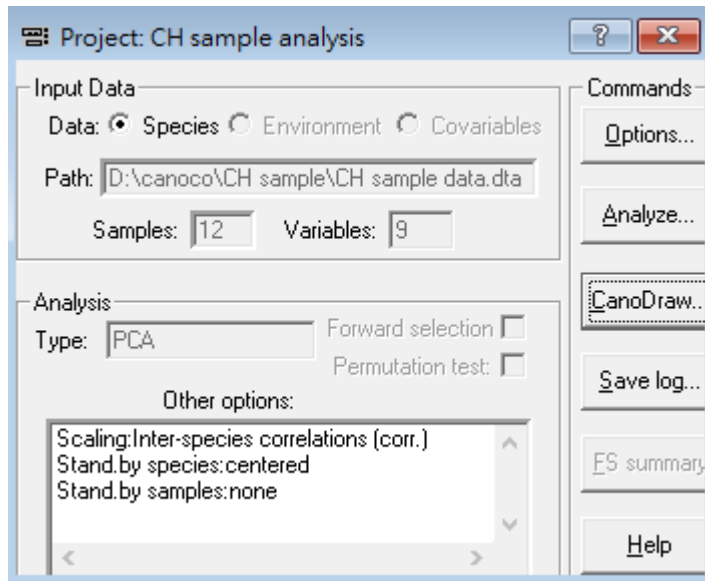
< 上一步(B) 下一步(N) > 取消 說明

7.線性方法部分於 focus scaling on 下選擇 inter-species correlation，在 species scores 處選擇 divide by standard deviation，剩餘選項若無特別需求則無需更動

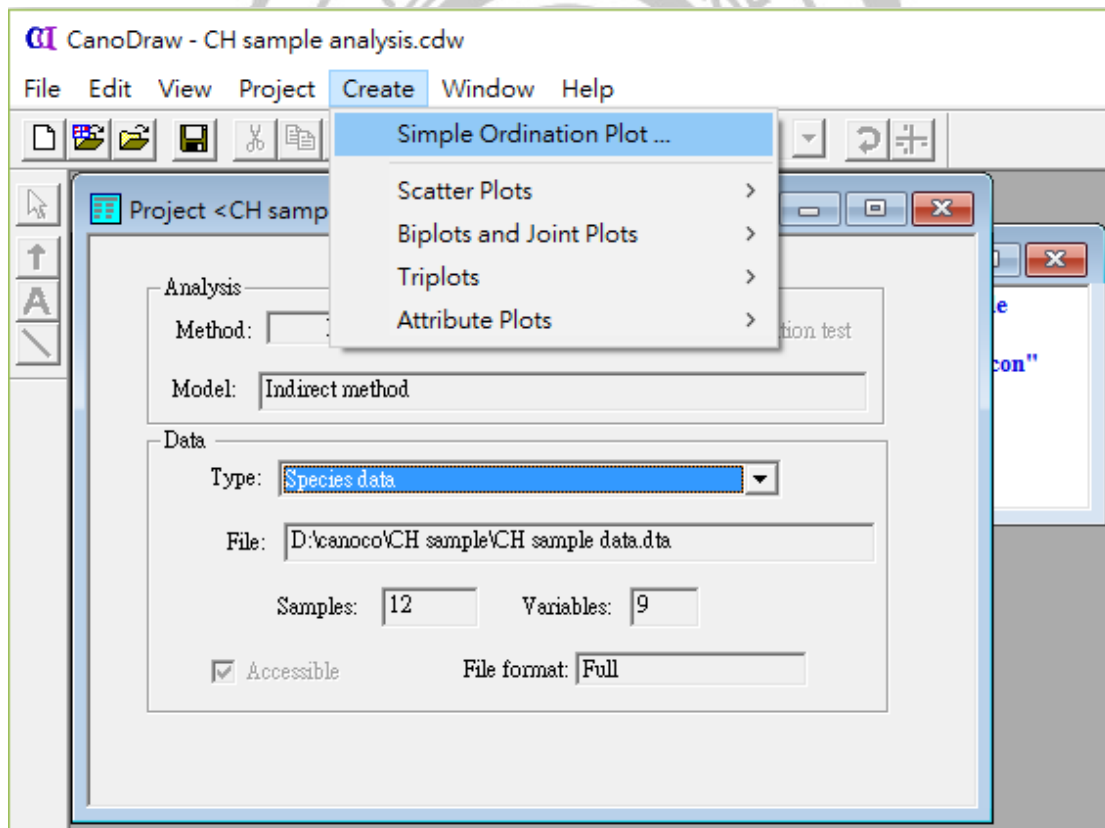
Focus scaling on:	Species scores:
<input type="radio"/> Inter-sample distances	<input checked="" type="radio"/> Divide by standard deviation
<input checked="" type="radio"/> Inter-species correlations	<input type="radio"/> Do not post-transform
<input type="radio"/> Symmetric	

< 上一步(B) 下一步(N) > 取消 說明

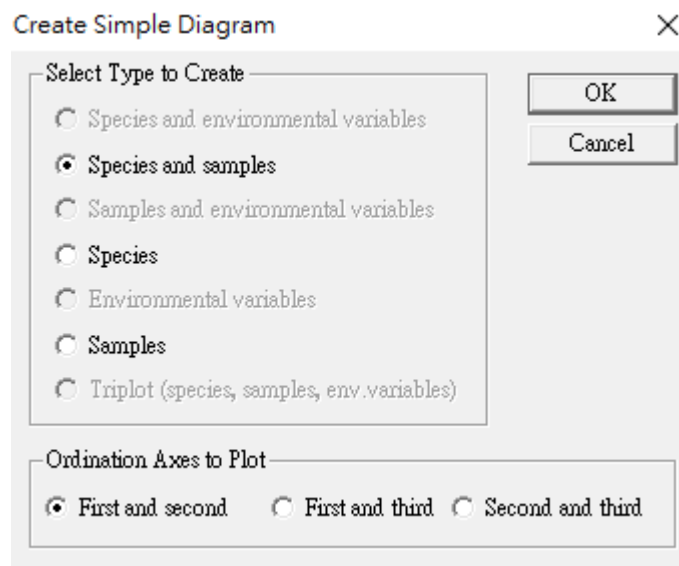
8.完成後另存新檔，點選 Analyze 進行分析，之後點選 CanoDraw 繪製圖表



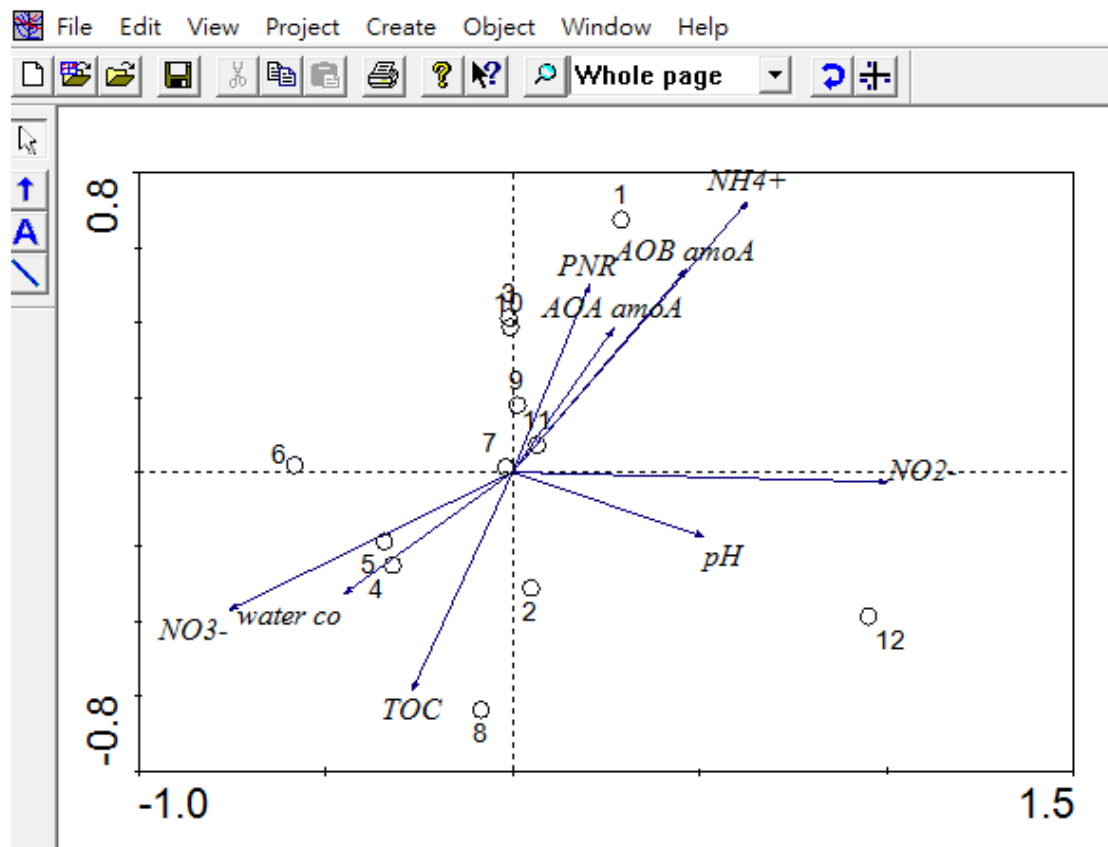
9.同樣另存新檔後選擇 Create 下的 Simple Ordination Plot



10.選擇 Species and sample 後點選 OK 進行繪製



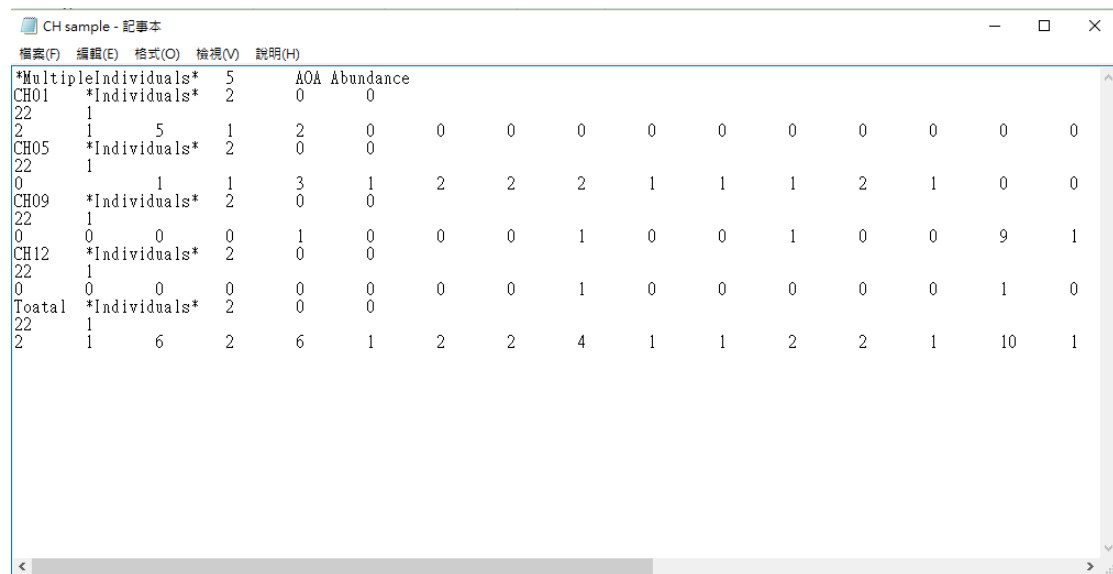
11.完成後即可取得 PCA 分析圖，若要進行文字等修改可直接於圖表上輸入



3.7 多樣性指標以及稀疏曲線

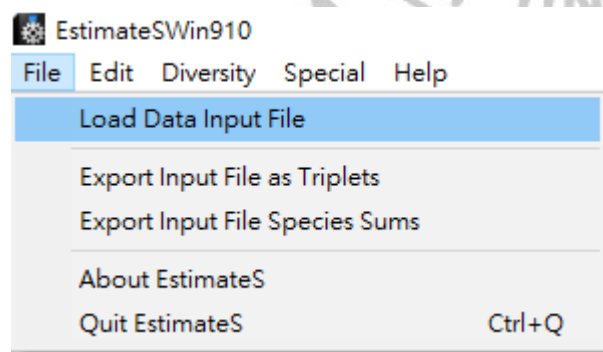
樣區中氨氧化古菌的物種豐度 (species richness) 和物種多樣性 (species diversity) 等各種指標以統計軟體 EstimateS 來進行資料分析。

1. 首先參照程式所給的格式文件 Multiple-Individual-Based-Example 將研究數據進行編排，並以.txt 文件格式存檔。

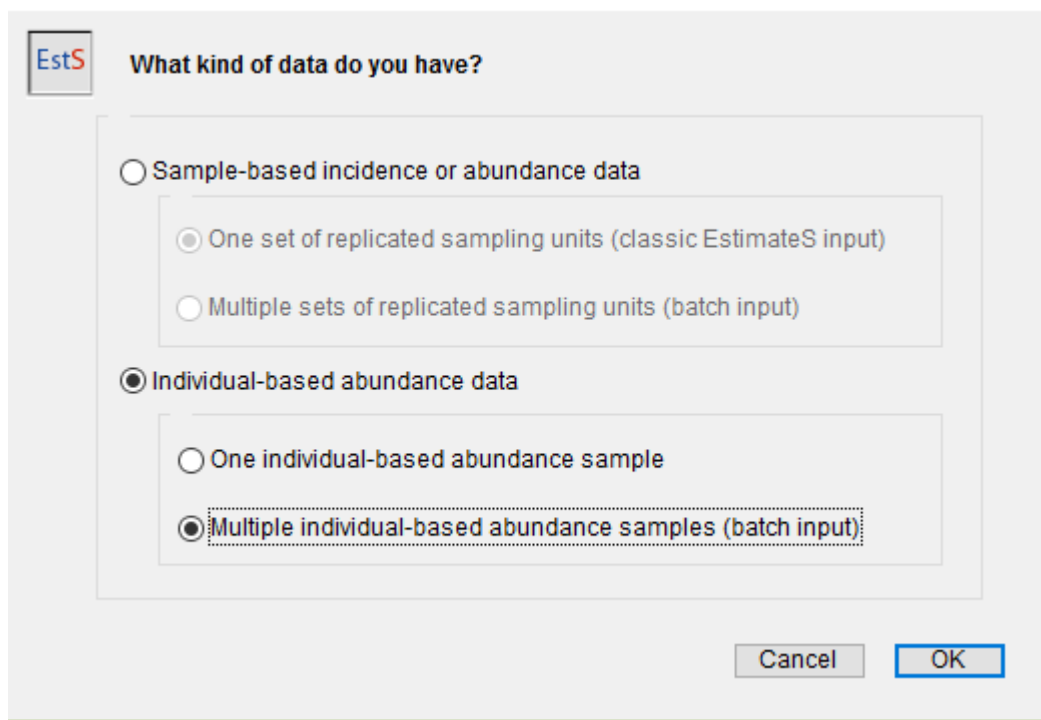


```
CH sample - 記事本
編寫(F) 編輯(E) 格式(O) 檢視(V) 說明(H)
*MultipleIndividuals* 5 AOA Abundance
CH01 *Individuals* 2 0 0
22 1
2 1 5 1 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
CH05 *Individuals* 2 0 0
22 1
0 1 1 1 3 1 2 2 2 1 1 1 2 1 0 0
CH09 *Individuals* 2 0 0
22 1
0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 1 0 0 9 1
CH12 *Individuals* 2 0 0
22 1
0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 1 0
Toatal *Individuals* 2 0 0
22 1
2 1 6 2 6 1 2 2 4 1 1 2 2 1 10 1
```

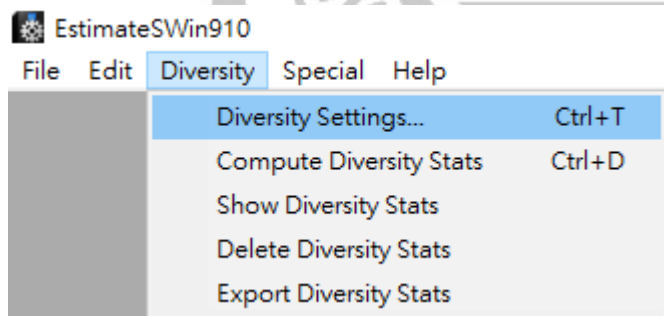
2. 打開程式後點選 File 選擇 Load Data Input File



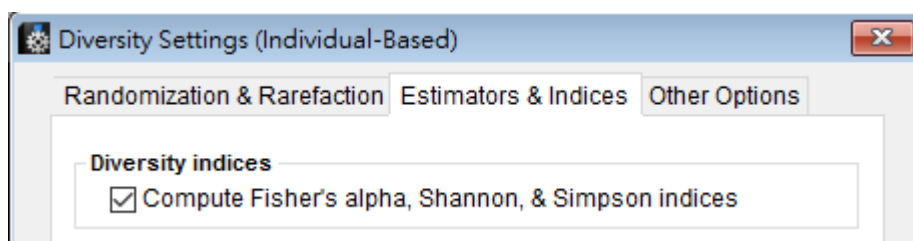
3.檔案匯入時選擇 Individual-Based abundance data 下的 Multiple Individual-Based Example abundance samples(batch input)



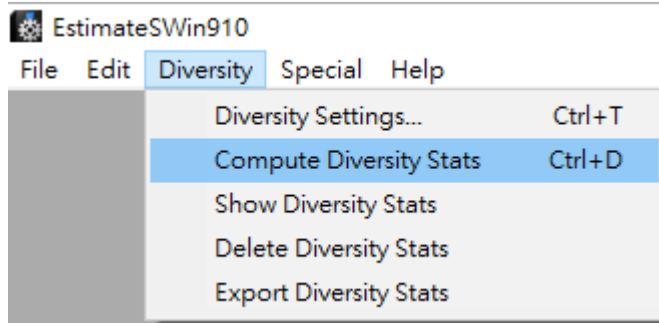
4.匯入檔案後選擇 Diversity Settings



5.在 Estimators & Indices 選項下的 Diversity indices 處勾選 Compute Fisher's alpha, Shannon, & Simpson indices，其餘設定若無特別需求則無需更動



6. 設定完成後點選 Compute Diversity Stats



7. 運算結束後另存為文字格式的.txt 檔案，打開檔案後將數據轉入 Excel 中利於閱覽，各個多樣性指標在各樣點下方處，而稀疏曲線數據則見於 S Mean 此列

EstimateS (Version 9.1.0), Copyright R. K. Colwell: <http://purl.oclc.org/estimates>
 Diversity Output from Input File: CH01 (2015, 十一月 30,)
 Reference Sample = 11

Individual	S(est)	S(est)	95% S(est)	95% S(est)	SD	S Mean (n)	Singletons	Singletons	Doubleton	Doubleton	ACE	Mean	ACE	SD	(Chao 1	Mean
1	1	0.32	1.68	0.35		1	1	0	0	0		1	0		1	
2	1.78	0.71	2.85	0.54		1.83	1.66	0.76	0.17	0.38		2.25	0.57		2.25	
3	2.41	1.13	3.68	0.65		2.43	1.9	1.06	0.49	0.5		3.37	1.55		3.37	
4	2.92	1.53	4.3	0.71		2.99	2.12	1.17	0.73	0.62		4.19	2.37		4.19	
5	3.35	1.9	4.8	0.74		3.41	2.18	1	0.9	0.76		4.35	1.83		4.35	
6	3.73	2.23	5.22	0.76		3.81	2.33	0.99	0.91	0.9		5.03	1.59		5.03	
7	4.05	2.52	5.59	0.78		4.05	2.24	1.16	0.99	0.87		5.48	2.35		5.48	
8	4.35	2.77	5.93	0.81		4.3	2.23	1.06	1.13	0.76		5.51	2.05		5.51	
9	4.6	2.98	6.22	0.83		4.59	2.22	0.87	1.37	0.58		5.47	1.47		5.47	
10	4.82	3.15	6.49	0.85		4.79	2.08	0.71	1.71	0.46		5.33	0.82		5.33	
11	5	3.28	6.72	0.88		5	2	0	2	0		5.3	0		5.3	

第四章 結果與討論

4.1 二月樣本調查

4.1.1 二月土壤化學特性

在整個二月的樣本中，pH 的範圍從 7.49 至 8.62 (Table 4-1)，整體變動的幅度不大，而從文獻來看，氨氧化古菌的適應範圍雖然較廣 (pH 3.7–8.65) (Erguder *et al.*, 2009)，但氨氧化族群的適合生長條件通常在中性偏鹼的環境下 (pH 7.0 - 7.8) (Könneke *et al.*, 2005, Jung *et al.*, 2011, Hatzenpichler *et al.*, 2008, Tourna *et al.*, 2011)，這一區域的 pH 值正好滿足了氨氧化族群的生長需求，也因此預期這一區域中 pH 值不會是主要影響氨氧化族群豐度的環境因子，因為當 pH 對於全部氨氧化族群都有顯著的正面效益時，其中的個別的差異可能無法明顯看出。

由於樣區為河口溼地，受潮汐影響，一日中有一半的時間是處在水面下，與其他類型土壤 (草原土壤:9.2% - 13.0%) 相比大部分的樣點含水率偏高 (Chen *et al.*, 2013)，含水率範圍從 19.1 至 38.6% (Table 4-1)，而其中最高的幾個樣點 (CH04、CH05、CH06、CH09 和 CH11) 可能是由於這些樣點較偏向為泥質灘地，土壤粒徑較小，對於水分的保留也比其他樣點來的有效。

潛在硝化速率 (PNR) 從 0.18 至 1.21 mg NO₂/kg soil/day (Table 4-1)，這一數據可反映此區域的硝化作用的活性，同時也確認了氨氧化族群的存在。另各樣點間土壤中的氨氮、亞硝酸鹽氮、硝酸鹽氮濃度有明顯的變動幅度，從以往研究文獻中也確認了 pH 和氨氮濃度是對於氨氧化族群最主要的兩個影響因子 (Stahl and Torre., 2012)，而本研究樣區中氨氮濃度從 0.36 至 15.25 mg/kg soil，同時也存在著濃度梯度，也因此預期此樣區中氨氮對於氨氧化族群會有顯著的影響。

最後，總有機碳在此區域中範圍是 1.14 至 13.16 g/kg soil (Table 4-1)。目前異營性的氨氧化細菌已確認存在，雖然大多環境還是以自營性的氨氮

化細菌為主導，但當環境中存在高濃度的有機物時可能會使異營性的氨氧化菌取得主導地位，因此在此樣區中有機碳的濃度有可能會對氨氧化細菌的族群豐度有所影響。而在氨氧化古菌的部分，從已往的研究中有發現部分氨氧化古菌存在著混營的特性，例如 *Nitrososphaera viennensis* 在含有低濃度的 pyruvate (<0.05 mM) 時生長速率有增加的趨勢 (Tourna *et al.*, 2011)，同時在某些特殊環境下 (煉油廠廢水處理系統) 所存在的氨氧化古菌也顯示了異營性的可能 (Mußmann *et al.*, 2011)，不過目前還沒有確切證據顯示異營性氨氧化古菌的存在，因此在這一樣區中有機碳對氨氧化古菌的影響還需要由後續分析來確認。

4.1.2 二月土壤環境因子間的關聯性

在整個樣區中，pH 值和有機碳濃度對於其他環境因子之間關聯的顯著性都未達顯著標準 (significance >0.05 ，也寫作 $p > 0.05$) (Table 4-2)，其中 pH 的部分無關聯性的原因推測是由於變動幅度不大，因此無法判別出個別的顯著的影響，而從其他區域的研究中來看 (Yao *et al.*, 2011)，當 pH 變化範圍拉大時，對於其他因子有顯著的關聯性存在，也因此若本區域中 pH 存在著明顯的梯度變化，則與各項因子間的關聯性應該會更為明顯。含水率在相關的研究中，通常會考慮一些其他的因素，如植被和土地利用等 (Chen *et al.*, 2013)，也因此含水率對於氨氧化族群可能較偏向一個間接的影響因子，而在此區域中，含水率與氨氮濃度間存在著一個顯著的 ($p = 0.05$) 負相關性 (Correlation coefficient = -0.584 ，也寫作 $r = -0.854$) (Table 4-2)，這顯示了在這些樣點中土壤含水率越高時氨氮濃度反而有下降的趨勢，而原因可能是漲潮時被海水覆蓋，造成土壤中的氨氮被稀釋，但由於其他環境因子並沒有顯示出顯著的關聯性，表示其他的含氮化合物並沒有明顯的稀釋情況，因此這一推測無法確定。

潛在硝化速率和氨氮濃度間存在著顯著正相關性 ($r = 0.592$, $p = 0.04$)

(Table 4-2), 顯示了在這些樣點中, 硝化速率隨著基質濃度的上升而提高, 同時也表示此樣區中總體的氨氮還未達抑制氨氧化族群的濃度, 而氨氮濃度和亞硝酸鹽氮濃度呈顯著正相關 ($r = 0.609, p = 0.04$), 這也表示了環境中氨氧化作用的活性。最後, 硝酸鹽氮與氨氮 ($r = -0.694, p = 0.01$) 和亞硝酸鹽氮 ($r = -0.743, p = 0.01$) 都呈現了顯著的負相關性, 這一結果可能表示在這一樣區中, 各個樣點的硝化作用處於不同的平衡狀態, 當環境中的氨氮增加時, 會促進硝化作用, 整個硝化過程也會較為活躍, 但最終產物的硝酸鹽開始累積時, 反應開始被抑制, 而硝化速率也趨於緩和, 這一情況在一針對草原土壤中氨氧化作用的研究也有出現 (Stempfhuber *et al.*, 2014), 當氨氮濃度高達 27.1 ppm 時, 硝酸鹽氮只有 3.9 ppm, 而硝酸鹽氮高達 34.5 ppm 時, 氨氮濃度反而只有 17.7 ppm, 兩者間有明顯的負相關性。

4.1.3 二月土壤中 AOA 與 AOB 豐度

在全部 12 個樣點中, 氨氧化古菌的 *amoA* 基因豐度 (copies/g soil) 在 CH01 為 4.43×10^6 , 在 CH02 為 1.13×10^5 , 在 CH03 為 7.12×10^6 , 在 CH04 為 2.96×10^5 , 在 CH05 為 2.70×10^5 , 在 CH06 為 5.53×10^5 , 在 CH07 為 2.68×10^5 , 在 CH08 為 2.32×10^6 , 在 CH09 為 1.39×10^6 , 在 CH10 為 2.82×10^5 , 在 CH11 為 6.11×10^5 , 在 CH12 為 9.81×10^5 (Fig 4-1)。而氨氧化細菌的 *amoA* 基因豐度 (copies/g soil) 在 CH01 為 3.55×10^8 , 在 CH02 為 2.51×10^4 , 在 CH03 為 4.17×10^4 , 在 CH04 為 1.15×10^5 , 在 CH05 為 6.03×10^3 , 在 CH06 為 1.59×10^3 , 在 CH07 為 1.26×10^4 , 在 CH08 為 5.01×10^2 , 在 CH09 為 1.59×10^3 , 在 CH10 為 1.62×10^5 , 在 CH11 為 1.26×10^7 , 在 CH12 為 3.02×10^5 (Fig 4-1), 基因豐度另以已知的 copies 數量回算細胞數量以代表實際微生物數量 (Fig 4-2)。總體來看氨氧化古菌豐度的變化幅度較小, 且在大部分樣點中豐度都高於氨氧化細

菌，而氨氧化細菌雖然有少數樣點出現高於氨氧化古菌兩個次方等級以上的情況，但其他區域都與氨氧化古菌有一個到兩個的次方差距，甚至有出現接近四個次方的差距（CH08），這也顯示了雖然氨氧化細菌在某些區域中數量較豐，但整體的變化較大，表現出對於環境變化較低的耐受性。而氨氧化古菌則相反，氨氧化古菌的整體變化較為穩定，確切來說則是沒有較為突出的情況，但這也顯示了氨氧化古菌在這些樣點中都能穩定存在的事實，對於環境變化也表現出較高的耐受性，因此從整體區域來看，氨氧化古菌的豐富度高於氨氧化細菌。

4.1.4 二月土壤環境因子對氨氧化族群的影響

利用皮爾森相關係數分析的結果顯示，pH 的部分如同預期的對於氨氧化古菌和氨氧化細菌的豐度沒有顯著的影響 ($p > 0.05$) (Table 4-3)，原因如前所述，pH 在這一區域中對於不管是氨氧化古菌還是氨氧化細菌都有著良好的正面效益，也因此在此差距不大的情況下無法判別出 pH 的影響。氨氧化作用的酵素一般認為是以氨氮來做為基質，而 pH 值則會影響氨氮和銨之間的轉換，當處於酸性環境時，氨氮的可利用性也會下降，雖然也有研究發現到在 pH = 2.9 的酸性土壤中有低豐度的氨氧化細菌存在 (Schmidt *et al.*, 2007)，但氨氧化細菌主要還是被認為適合於中性偏鹼的環境下。而氨氧化古菌也有類似的情況，目前對於氨氧化古菌的研究中已確認了氨氧化古菌可生長在寬廣的 pH 值範圍下，在 pH 3.7–8.7 的各種環境中都有氨氧化古菌的存在 (Reigstad *et al.*, 2008, He *et al.*, 2007, Wieldier *et al.*, 2007)，而這也使得對於氨氧化古菌基質的利用形式無法有確切的定論，不過從各種現有的氨氧化古菌培養研究來看，除了少數特例以外 (*Ca. Nitrosotalea devanterra* 最適生長條件 pH = 4.5) (Lehtovirta-Morley *et al.*, 2011)，大多數的氨氧化古菌所適合的生長條件也是屬於中性偏鹼性的環境 (Könneke *et al.*, 2005, Jung *et al.*, 2011, Hatzenpichler *et al.*, 2008, Tourna

et al., 2012), 這表示氨氧化古菌雖然可適應於酸性, 但大部分氨氧化古菌對於中性偏性的環境更為有利。另外, 雖然也有研究在 pH 值範圍更小的環境中發現到 pH 值對於氨氧化古菌和氨氧化細菌的關聯性 (Wang *et al.*, 2011), 但本研究中可能由於其他的交互影響而使得 pH 值的影響較不明顯, 所以從分析結果來看雖然無法有明確的影響, 但實際上無法排除 pH 對於氨氧化古菌和氨氧化細菌的影響。

氨氮濃度對於氨氧化古菌 ($r=0.589, p=0.04$) 和氨氧化細菌 ($r=0.739, p=0.01$) 都有著顯著正相關存在, 同時對於氨氧化細菌的顯著性又高於氨氧化古菌, 這一結果確實顯示出氨氧化細菌對於基質的依賴性高於氨氧化古菌, 而以往研究中也顯示當氨氮濃度為限制因子時, 由於氨氧化古菌較低的 K_m 值以及基質利用閾值 (Martens-Habbena *et al.*, 2009) 而使得氨氧化古菌能佔據有利的主導優勢。也因此氨氮濃度高的區域中, 氨氧化細菌可以快速的生長來占據主導地位, 但是在氨氮濃度低的區域下, 生長情況則明顯趨緩, 反觀氨氧化古菌則是在各種情況下穩定生長, 不過這一差異可能不只是因為對於基質親和力的差距所導致, 在近來的研究中也顯示了這兩種物種由於固碳途徑的不同 (氨氧化細菌以 Calvin cycle 進行固碳, 氨氧化古菌以改進的 HP/HB cycle 進行固碳) (Könneke *et al.*, 2014), 所導致能量使用上效益的差距, 也因為氨氧化古菌有著更為高效的能量使用方式, 在基質的需求上或許也因此比氨氧化細菌來的有利。

從潛在硝化速率和氨氧化族群的及關聯性來看 (Table 4-3), 對氨氧化古菌基因豐度有著顯著的正相關性 ($r=0.738, p=0.01$), 而氨氧化細菌則沒有顯著的相關性存在 ($p > 0.05$), 而潛在硝化速率在本研究中所代表的意義是在固定時間中所能進行的氨氧化作用, 而這一指標與氨氧化古菌存在了顯著的關連, 這結果表示雖然氨氧化細菌在某些樣點有高於氨氧化古菌的情況發生, 但整個樣區中對於氨氧化作用的貢獻還是氨氧化古菌來的多, 也因此整個河口溼地樣區裡, 氨氧化作用可能是由氨氧化古菌來進

行主導。

在總有機碳的部分，對於氨氧化古菌和氨氧化細菌都不存在顯著的關聯性 ($p > 0.05$)，顯示了此區域中的氨氧化族群依然是由自營性的古菌和細菌所主導，異營性的氨氧化細菌佔主導的情況一般是污水廠中有機物充足的環境下，在這種情況時，雖然異營性氨氧化細菌進行氨氧化作用的效率較自營性氨氧化細菌低，但由於有機物充足而使得數量上可高過自營性氨氧化細菌數倍，因此能對氨氧化作用有較大貢獻。而氨氧化古菌的情況則較為不同，從培養的研究中有發現到 *N. maritimus* 受有機物抑制的情況 (Könneke *et al.*, 2005)，但也有發現到 *N. viennensis* 出現利用有機物的情況 (Tourna *et al.*, 2011)，因此氨氧化古菌對於有機物的影響可能會由於系統發育型態 (phylogenetic types) 的不同而有較大的差異，不過在目前的研究中，氨氧化古菌混營性的特性在環境中還未被觀察到，而有機物對於氨氧化古菌的抑制現象也屬於少部分，因此這一結果在可接受範圍內。

4.1.5 二月土壤 AOA 族群組成和演化分析

在 2 月土樣的 50 個 clone 定序樣本中，成功獲得的 44 條氨氧化古菌 *amoA* 基因序列中，以 97% 相似度為基準劃分 OTU，分析結果中 4 個較大的族群 OTU1、OTU3、OTU8 以及 OTU9 都屬於 Group I.1a (Fig 4-2)，其中 OTU1 所比對的結果是來自淡水水族館的序列 (KJ472720)，OTU3 比對的結果則是來自鹹水水族館的序列 (KC758426)，OTU8 以及 OTU9 比對的結果則是來自潮間帶灘地以及河口底泥的序列 (KP026137、FJ227157)，除了 OTU1 以外其餘主要族群均與本研究的環境相似或符合。由於序列在進行比對時，一部分歸類於 Group I.1a 的序列最接近的親緣關係只能比對到未分離純化的序列，因此最後選定以 *Nitrosopumilus maritimus* 這株純菌做為代表，將本研究中歸類於 Group I.1a 的氨氧化古菌統稱為 *Nitrosopumilus.sp*，雖然有一些序列在親緣樹上與 *Nitrosopumilus*

maritimus 關係較為遙遠，但還是認定此區域中應是 *Nitrosopumilus.sp* 作為主要的氮氧化古菌族群，在這一區域中來負責氮氧化作用的進行。

而在全部 44 條序列中共分出 16 個 OTU (Fig 4-3)，歸類於 Group I.1a 海洋族群的有 9 個 OTU 共 34 條序列，佔全部序列的 74%，而歸類於 Group I.1b 土壤族群的有 7 個 OTU 共 10 條序列，佔全部序列的 26% (Fig 4-4)，這一結果表明了此區域中的氮氧化古菌主要來自於海洋，而原本屬於土壤中的氮氧化古菌則占少數，類似的結果也出現在同樣以河口區域為目標的研究中 (Singh *et al.*, 2010)，同時這也顯示了在河口溼地這一特殊環境下，Group I.1a 的氮氧化古菌比 Group I.1b 更佔有優勢地位。

4.1.6 二月土壤整體變量綜合分析

由主成分分析的結果顯示，主成分 1 和 2 分別解釋了 85.2% 以及 12.3% 的變量，而從分析圖上也可以簡略的看到前面所述的各變量間關聯性 (Fig 4-5)，同時也呈現了整體上變量間的關係以及樣點特性上的差異，在分析圖上可以看到，9 個變量中可分為 3 個群組，分別是 NH_4^+ 、PNR、AOA 和 AOB 這一群組，pH 和 NO_2^- 這一群組，以及含水率和 NO_3^- 這一群組，這三個群組在變異性的趨勢上較為相近，而 TOC 與各個群組的變異性趨勢則較為相異。

第一個群組明顯的與硝化作用有所關聯，此群組中各個變量與硝化作用都有直接關係，而第二個群組可能在一定程度上顯示出氮氧化作用所受到 pH 值的影響，不過在相關性分析的部分這兩個變量的關聯性並不顯著，因此無法明確判斷此群組的代表意義，而第三個群組則表示了此地的硝化作用可能還有其他的環境因子的間接影響，因為含水率所代表的意義可以是不同的潮汐影響或土壤粒徑等因素，而這些因素又會產生不同的基質擴散速率、吸附能力或是稀釋程度等條件，因此這部分所代表的意義判斷為硝化作用與其他因子的間接影響。

再從個別樣點來看，在這一樣區中彼此樣點間的差異是相對較大的，除了少部分有較為集中的趨勢以外，大部分的樣點是呈現分散的情況，這也顯示出彰濱地區中各樣個點特性的相異程度。這一樣區中主要可區分成 3 個集群，有高度相似性的 2 個集群分別為 CH03 和 CH10 以及 CH04 和 CH05，以及存在相似度的 CH07、CH09 和 CH11 這一集群，而其餘樣點則是在相互之間存有較大的差異。

4.2 十月土樣調查

4.2.1 十月土壤化學特性

十月 4 個樣點中，pH 的範圍是 7.99 至 8.61 (Table 4-4)，和整體調查時同樣無明顯差距存在，不過個別樣點中有上升的情況。含水率 22.9 至 38.3 %，個別樣點中無明顯變化，由於採樣時間係配合潮汐時間並與前次整體調查的時間相同，因此潮汐影響可視為一致，而土壤粒徑一般來說不會於短期中劇烈改變，因此含水率與整體調查時所得測值並無太大改變。

氨氮濃度 0.44 至 5.83 mg/kg soil，個別樣點中除了 CH05 以外都有下降趨勢，特別是在樣點 CH01 下降程度最高，從二月的 15.25 下降至 5.83 mg/kg soil，下降程度次高的樣點 CH12 也從二月的 8.59 下降至 3.95 mg/kg soil，這顯示出此區域的氨氮濃度並非穩定，而改變的原因不排除來源的變化以及微生物族群的增長。亞硝酸鹽濃度為 67.29 至 143.01 $\mu\text{g/kg soil}$ ，除了樣點 CH01 下降以外，其他樣點都有上升趨勢，而硝酸鹽濃度為 3.63 至 19.68 mg/kg soil，除了樣點 CH05 上升以外，其餘樣點皆為下降。

潛在硝化速率 0.35 至 1.70 $\text{NO}_2^- \text{ mg/kg/day}$ ，其中的樣點 CH01 從二月的 0.77 上升至 1.70 $\text{NO}_2^- \text{ mg/kg/day}$ ，在 4 個樣點中上升幅度最大，其餘樣點除了 CH09 之外，剩餘兩個樣點都微幅下降，但和 2 月相比則無太大變化。樣點 CH09 從 2 月時的潛在硝化速率 0.18 上升至 0.48 $\text{NO}_2^- \text{ mg/kg/day}$ ，推測可能的原因有兩個，第一種可能是由於樣點中的 pH 值上升至適合氮

氧化古菌適合進行氨氧化作用的範圍，這一範圍從以往的研究 (Jung *et al.*, 2011, Hatzenoichler *et al.*, 2008) 來看大約在 pH 7.0–7.8 左右，也因此促進了整個過程使其速率上升，不過這部分無法解釋 CH05 同樣在 pH 值上升時潛在硝化速率卻下降的情況，因此這一原因無法完全確定。另一種可能是 CH09 於 2 月時潛在硝化速率有被抑制的情況，而 10 月則恢復到正常條件，這一推測是從 2 月整體調查時的潛在硝化速率平均值而來，因為整體樣區的平均值為 0.44 NO₂⁻ mg/kg/day，而 CH09 上升的範圍也接近這一平均值，因此這一推測可合理的解釋這個情況。不過這一結果也帶出了另一個未知原因，也就是 2 月時對於潛在硝化速率的抑制因子，原本從 2 月整體數據來看，可能的抑制條件是最終產物累積時進而減緩硝化速率，不過將 2 月及 10 月的數據進行比較後發現，10 月 CH05 的最終產物濃度也就是硝酸鹽並沒有太大變化，這也表示 10 月樣本中減弱的抑制因子並非硝酸鹽，而可能是其他未檢測的環境因子。

樣點 CH01 是整個 10 月樣本中潛在硝化速率上升最多的區域，這一情況的可能原因推測有兩個，第一個可能原因就如前面所述，由於 pH 上升至更為適合的條件，因此促進了硝化作用的進程，但如同前面提到的這一推測無法解釋 CH05 的情況，因此不能完全確定，不過也有可能是 CH05 有其他未檢測的抑制因子，在交互作用下造成潛在硝化速率沒有明顯變化。第二個可能原因是 CH01 整體的最終產物累積情況有所改善，進而促進了潛在硝化速率，而這一推測是從亞硝酸鹽濃度和硝酸鹽濃度得出，在 10 月時這兩項檢測數據都有下降的趨勢，這情況可能表示了此處的亞硝酸鹽被更快的轉變成了硝酸鹽，而此區由於外源性的氨氮持續流入，因此當最終產物累積的情況減弱時對於潛在硝化速率有明顯的促進作用。

土壤鹽度為 10 月分析時增加項目，2 月整體調查時並無此項土壤特性的數據，因此無法進行比較，而增加此項分析是由於後續分析中族群調查時發現樣點間的對應族群有其規律，因此為了確認增測此項分析，而此特

性檢測結果與樣點受潮汐影響時間的長短有關，這部分也解釋了後續分析中所觀測到的族群結構現況。

4.2.2 十月土壤中 AOA 與 AOB 豐度

在十月的樣本中，氨氧化古菌的豐度介於 $3.87 \times 10^5 - 1.40 \times 10^7$ copies/g soil (Fig 4-6)，在 CH01 和 CH05 中有上升的趨勢，而在 CH09 以及 CH12 有下降的情況，氨氧化細菌的豐度介於 $5.01 \times 10^2 - 5.62 \times 10^5$ copies/g soil，除了 CH05 的豐度有上升以外，其餘樣點皆為下降。與二月樣本相比，氨氧化古菌的豐度在經過一段時間後變化幅度依然不大，不管是整體上或是從個別樣點來看，這同時也再次證明氨氧化古菌的族群在此區域中相對穩定，受到外在因素改變的影響較小。氨氧化細菌則有不一樣的情況，與二月樣本比較可以發現，氨氧化細菌的豐度變化幅度較大，受到環境因子的影響比氨氧化古菌來的顯著，各樣點間的變化趨勢同土壤特性來看可以發現，在氨氮濃度下降的區域中氨氧化細菌豐度也都是下降的情況，這也再次證實了此區域中氨氮對於氨氧化細菌的影響比氨氧化古菌來的更大。

再以氨氧化古菌和氨氧化細菌豐度變化來看土壤特性的變化特別是潛在硝化速率，從二月樣本所得結果顯示此區潛在硝化速率與氨氧化古菌有顯著關聯性存在，這也表示此樣區中這一過程可能由氨氧化古菌所主導，而十月樣本中這一結果也再次確認，以樣點 CH01 來看，當氨氧化細菌豐度從 3.55×10^8 下降到 5.62×10^5 copies/g soil 時，潛在硝化速率反而大幅上升，明顯可看出在這一樣點中氨氧化細菌並非主導氨氧化作用的族群，同時來看氨氧化古菌豐度從 4.43×10^6 上升到 1.40×10^7 copies/g soil，也明確顯示出潛在硝化速率的上升與氨氧化古菌有所關聯。不過從其他的研究顯示 (Stahl and Torre., 2012)，氨氧化古菌進行氨氧化作用的速率在相同條件下並不比氨氧化細菌來的快，因此這一樣點潛在硝化速率的增長原因，應包含了其他環境因子的影響，如前面所述的 pH 值上升至更適合進行氨

氧化的範圍，以及最終產物累積的情況有所改善，連帶促進了整個硝化過程。

最後，鹽度對氨氧化古菌和氨氧化細菌的影響，從以往的文獻中可發現會依照地區不同而有相異的結果，而在本研究中，從結果來看可發現鹽度提高時氨氧化古菌豐度也有上升的趨勢，對於氨氧化細菌則沒有明顯的關係，相似的結果也出現在一鹽度梯度下的研究 (psu 0 - 20) (Bernhard *et al.*, 2010)，但與一舊金山灣的研究結果相異 (psu 0.2 - 31) (Mosier and Francis, 2008)，這也顯示出在此環境下氨氧化古菌和氨氧化細菌豐度的變化可能是許多複雜的環境因子影響所產生的結果。

4.2.3 十月土壤 AOA 族群結構、多樣性以及親緣分析

在十月土樣中，4 個樣點分別送交了 20 個 clone 樣本定序，共 80 個 clone 樣本，並成功獲得 64 條氨氧化古菌 *amoA* 基因序列，再以 97% 序列相似度為基準劃分為個別 OTU。將 4 個樣點所得序列進行親緣分析後 (Fig 4-7)，CH01 的樣本有 11 條序列並歸類於 6 個 OTU (Fig 4-8)，其中有 3 個 OTU 共 7 條序列歸類於 Group I.1a，所占比例約 64%，有 3 個 OTU 共 4 條序列歸類於 Group I.1b，所占比例約 36% (Fig 4-9)。CH05 有 18 條序列並歸類於 12 個 OTU，其中有 6 個 OTU 共 6 條序列歸類於 Group I.1a，所占比例約 33%，有 6 個 OTU 共 12 條序列歸類於 Group I.1b，所占比例約 67%。CH09 有 18 條序列並歸類於 8 個 OTU，其中有 5 個 OTU 共 14 條序列歸類於 Group I.1a，所占比例約 78%，有 3 個 OTU 共 4 條序列歸類於 Group I.1b，所占比例約 22%。CH12 有 17 條序列並歸類於 6 個 OTU，其中有 5 個 OTU 共 16 條序列歸類於 Group I.1a，所占比例約 94%，有 1 個 OTU 共 1 條序列歸類於 Group I.1b，所占比例約 6%。從整體來看，全部有 43 條序列約 67% 歸類於 Group I.1a，另有 21 條序列約 33% 歸類於 Group I.1b。

更進一步來看各樣點的族群結構，CH01 的主要氨氧化古菌族群為 AOA-Oct-OTU03，在此樣點的氨氧化古菌中占 36%，而 CH05 的氨氧化古菌族群較為豐富，且各族群中有沒有較為凸顯得存在，而 CH09 中的主要氨氧化古菌族群為 AOA-Oct-OTU17，在此樣點的氨氧化古菌中占 39%，CH12 的主要氨氧化古菌族群為 AOA-Oct-OTU22，占此樣點中氨氧化古菌的 59%。在全部 4 個樣點中，以物種豐富度以及多樣性來看 (Table 4-5)，樣點 CH05 遠比其他 3 個樣點來的高，而剩餘 3 個樣點以物種豐富度高低來排序則是 CH09、CH12 以及最後的 CH01，不過若是以物種多樣性來看，CH12 物種多樣性反而比 CH01 來的低。

從整個族群結構來看，族群比例大致與 2 月數據相符，這也顯示出氨氧化古菌在經過一段時間後，族群的結構沒有太大的變化，而從土壤特性可得知此處環境是有所改變的，因此也再次應證氨氧化古菌對於環境因子的影響有較高耐受性。而在 4 個樣點中，除了 CH05 以外都明顯以 Group I.1a 為主要族群，而造成這一現象的原因，判斷為土壤鹽度這一因素所導致，在觀測到此現象時，由於從先前所測得的各項土壤特性中沒有明顯的趨勢變化來與這一族群結構產生關聯，因此無法明確判斷原因，之後從地理位置上的因素切入探討，發現到 CH05 在潮汐低點時可能離海較遠，這表示此樣點受海水覆蓋時間應比其他樣點短，同時在其他文獻中也提到鹽度控制了氨氧化古菌的族群結構 (Zhang *et al.*, 2015)，所以嘗試以土壤鹽度這一特性來與此現象進行關連。在測得數據後也證實了這一推測，CH05 的土壤鹽度 2.23 psu 在 4 個樣點中確實最低，因此可以判斷土壤鹽度在此區域中對於氨氧化古菌的族群結構有所影響，這也顯示就算都位於潮間帶，潮汐的影響也可能存在著極大的差異，而從以往文獻中也發現到 Group I.1a 對於鹽度的適應範圍廣泛，從低鹽度 (psu 5) (Mosier *et al.*, 2012) 到高鹽度 (psu 30) (Moin *et al.*, 2009) 都可以穩定存在，不過對於 Group I.1b 則沒有類似的結果，這也解釋了樣點 CH05 以外都以 Group I.1a 為主的原因。

4.2.4 十月樣本稀疏曲線分析

在十月樣本中為了進行氨氧化古菌族群結構的探討，因此將 4 個樣點都送交 20 個 clone 樣本進行定序，為了確定送交樣本是否充足進行了樣本稀疏曲線分析。在曲線圖的結果中可以看出，與 CH05 相比其餘樣點的分析曲線已趨平緩 (Fig 4-10)，這表示若要從現有樣本中再發現氨氧化古菌，需要的樣本數將大幅增加。反觀 CH05 的曲線依然保持著上升的趨勢，這顯示此樣點的氨氧化古菌族群數量還有很大的增長空間，這也代表 CH05 目前研究所得的族群多樣性有被低估的情況，實際現地情況的族群多樣性應較觀測到的高出許多。而 CH01、CH09 以及 CH12 的族群數量增長則接近極限，實際現地情況的族群多樣性應與觀測到的無太大差異。



第五章 結論與建議

5.1 結論

本研以台灣中部河口溼地進行氨氧化族群調查，藉由不同時間與空間下的環境因子和氨氧化族群豐度以及結構等數據，來探討此地區各個因子對氨氧化族群的影響，特別是氨氧化古菌，並判別出此地區主導氨氧化作用的族群。

本樣區中氨氧化古菌 *amoA* gene 豐度為 $1.12 \times 10^5 - 7.11 \times 10^6$ copies/g soil，氨氧化細菌 *amoA* gene 豐度為 $5.01 \times 10^2 - 3.58 \times 10^8$ copies/g soil，從環境特性與氨氧化族群豐度等結果顯示，此樣區中對於氨氧化古菌和氨氧化細菌的豐度有影響的主要是氨氮濃度，其中又以氨氧化細菌受到的影響更為顯著，也因此造成氨氧化細菌的豐度在少數樣點可勝於氨氧化古菌，而氨氧化古菌則可穩定存在於各個樣點的情況。而潛在硝化速率與氨氧化族群豐度的關係表明，此樣區中氨氧化古菌對於氨氧化作用有著顯著的貢獻。另外，從潛在硝化速率於不同樣點和不同月份下的數據與其他環境因子的關係來看，環境中的 pH 值以及硝化作用過程的產物（亞硝酸鹽、硝酸鹽）對於潛在硝化速率也存在著不可忽略的影響。

在整個研究中，於 2 月樣本的 44 條 Archaeal *amoA* 基因序列中獲得 16 個 OTU，其中 9 個 OTU 歸屬於 Group I.1a 並佔總體的 74%，7 個 OTU 歸屬於 Group I.1b 並佔總體的 26%，而 10 月樣本 64 條 Archaeal *amoA* 基因序列中獲得 25 個 OTU，其中 17 個 OTU 歸屬於 Group I.1a 並佔總體的 67%，8 個 OTU 歸屬於 Group I.1b 並佔總體的 33%。從個別樣點有出現 Group I.1b 為主要族群的情況，同時也由這一結果確認到此樣區中鹽度對於族群結構有顯著的影響，不過以整體樣區來看，此地區以 Group I.1a 的氨氧化古菌為主要族群。

5.2 建議

氮氧化古菌的生長緩慢，也因此各種培養的研究需要更長的時間才能得到結果，若要進一步了解氮氧化古菌生態分佈，環境的族群調查有其優勢存在，不過在進行研究時須注意環境中可能存在著複雜的影響因子，所以在進行之前須盡可能的找出影響氮氧化古菌數量之主要因子，或者可找出具有明顯濃度梯度的區域進行研究，使其可能出現的趨勢更為明顯，來降低結果判讀的難度。

氮氧化古菌目前被認為是廣泛存在於環境中，不過在如污水處理廠之人工系統裡依然以氮氧化細菌為主，但氮氧化細菌對於低濃度的氮氮處理效果並不理想，而對於氮氮排放日益嚴格的標準，氮氧化古菌或許也能在人工系統中占有一席之地，因此建議可朝下列方向對氮氧化古菌進行後續研究：

1. 對污水廠等人工系統中的氮氧化古菌進行族群結構層面的研究，並分析環境特性來了解氮氧化古菌在這一環境下的生態
2. 從環境中分離並純化氮氧化古菌菌株，同時進行生理生化特性的研究，將氮氧化古菌的認知進一步擴展
3. 可針對各種自然生態系統下的氮氧化古菌進行族群以及環境特性調查，增加對於氮氧化古菌的了解

Table 2-1 Classification and characteristics of ammonia oxidizing bacteria (AOB)

Genus	Species	Characteristics	Reference
	<i>europaea</i>	Gram-negative, rods, aerobic, motile, mesophilic	Winogradsky, 1892
	<i>communis</i>	aerobic, mesophilic, optimum temperature : 28°C	Koops <i>et al.</i> , 2001
<i>Nitrosomonas</i>	<i>eutropha</i>	Gram-negative, motile	Koops <i>et al.</i> , 2001
	<i>oligotropha</i>	Gram-negative, aerobic	Koops <i>et al.</i> , 2001
	<i>ureae</i>	aerobic, Mesophilic, optimum temperature : 28°C	Koops <i>et al.</i> , 2001
	<i>briensis</i>	aerobic, spirals, , motile	Winogradsky <i>et al.</i> , 1933
<i>Nitrospira</i>	<i>multiformis</i>	chemolithotrophs but can grow mixotrophically, mesophilic	Watson <i>et al.</i> 1971
	<i>tenius</i>	rods, motile, mesophilic, optimum pH 7-5-7.8	Harms <i>et al.</i> 1976
	<i>oceani</i>	cocci, motile, mesophilic	Watson <i>et al.</i> 1965
<i>Nitrosococcus</i>	<i>halophilus</i>	moderately halophilic, aerobic, mesophilic, Aquatic	Koops <i>et al.</i> , 1990

Table 2-2 Classification and characteristics of ammonia oxidizing archaea (AOA)

AOA	Classification	Environment	Culture	Genome	Reference
<i>Nitrosopumilus maritimus</i>	1.1a	Marine aquarium	Pure	+	Könneke <i>et al.</i> , (2005) Walker <i>et al.</i> , (2010)
<i>Ca. Nitrosopumilus koreensis</i>	1.1a	Marine sediment	-	+	Park <i>et al.</i> ,(2012)
<i>Ca. Nitrosopumilus salaria</i>	1.1a	Estuary sediment	-	+	Mosier <i>et al.</i> , (2012)
<i>Ca. Nitrosoarchaeum koreensis</i>	1.1a	Rhizosphere	Enriched	+	Kim <i>et al.</i> , (2011) Jung <i>et al.</i> , (2011)
<i>Ca. Nitrosoarchaeum limnia</i>	1.1a	Sediment	Enriched	+	Blainey <i>et al.</i> , (2011)
<i>Ca. Nitrosotalea devanaterrea</i>	1.1a - associated	Agricultural soil	Enriched	-	Lehtovirta-Morley <i>et al.</i> , (2011)
<i>Nitrososphaera viennensis</i>	1.1b	Garden soil	Pure	+	Tourna <i>et al.</i> , (2011)
<i>Ca. Nitrososphaera gargensis</i>	1.1b	Hot springs soil	Enriched	+	Hatzenpichler <i>et al.</i> , (2008)
<i>Ca. Nitrososphaera evergladensis</i>	1.1b	Everglades soil	Enriched	+	Zhalnina <i>et al.</i> , (2014)
<i>Ca. Nitrosocaldus yellowstonii</i>	ThAOA	Hot springs	Enriched	-	de la Torre <i>et al.</i> , (2008)

*Ca, candidatus

Table2-3 Energy efficiency of autotrophic carbon fixation cycles (Könneke *et al.*, 2014)

1 mole precursor or 1 g biomass	Calvin–Benson cycle (mole of high-energy bond of ATP)	HP/HB cycle	
		Crenarchaeota (mole of high-energy bond of ATP)	Thaumarchaeota (mole of high-energy bond of ATP)
Acetyl-CoA	7	6	4
Pyruvate	7	9 - 10	5
Phosphoenolpyruvate	8	10 - 11	7
Oxaloacetate	8	9 - 10	6
2-Oxoglutarate	15	15 - 16	10
Biomass (1 g)	0.12	0.13 - 0.15	0.09

Table2-4 Kinetic constants and properties of soil AOA and AOB (Prosser and Nicol, 2012)

Characteristic	Soil AOB	Soil AOA
maximum specific growth rate(μ_{max})	0.005 - 0.044 / h	0.015 - 0.027 / h
Saturation constant for growth(K_s)	4 - 125 μM NH_3	-
Maximum specific cell activity(V_{max})	4 - 23 fmol NH_3 / cell / h	0.57 fmol NH_3 / cell / h
Saturation constant for activity(K_m)	6 - 11 μM NH_3	0.0036 - 0.036 μM NH_3
Maximum specific biomass activity	30 - 80 nmol NH_3 / g protein / h	51.9 NH_3 / g protein / h

Table 3-1 Location of the study sites in Changhua

Sites	Coordinates	
CH01	24°12'17"N	120°28'54"E
CH02	24°10'11"N	120°27'45"E
CH03	24°07'30"N	120°26'22"E
CH04	24°05'07"N	120°25'23"E
CH05	24°03'22"N	120°24'25"E
CH06	24°03'05"N	120°24'08"E
CH07	24°02'24"N	120°22'26"E
CH08	23°59'31"N	120°20'53"E
CH09	23°58'01"N	120°19'19"E
CH10	23°56'15"N	120°18'23"E
CH11	23°52'30"N	120°17'13"E
CH12	23°51'30"N	120°15'35"E

Table 3-2 Reagents for PNR determination

Reagents	Component	Concentration(g/L)
PBS buffer	Sodium chloride	8
	Potassium chloride	0.2
	Disodium phosphate	0.2
	Monopotassium phosphate	0.2
	Ammonium sulfate	1 mM
Inhibitor	Potassium chlorate	12.25

Table 3-3 Reagents for ammonium determination

Reagents	Addition	Concentration(g/L)
Sodium hydroxide solution	sodium hydroxide	12
Sodium nitroprusside solution	sodium salicylate	85
	sodium nitroprusside	0.6
mixture solution	Sodium nitroprusside solution : Sodium hydroxide solution = 1 : 2	-

Table 3-4 Reagents for nitrite determination

Reagents	Addition	Concentration(g/L)
	85% phosphoric acid	100 ml/L
Chromogenic reagent	sulfanilamide	10
	N-(1-Naphthyl)ethylenediamine	1

Table 3-5 Agarose gel concentration and efficient range of DNA

Gel concentration (%)	DNA fragments (kb)
0.4	1.0 - 30
0.5	0.8 - 25
0.6	0.6 - 20
0.8	0.5 - 15
1.0	0.3 - 12
1.5	0.2 - 10
2.0	0.1 - 2

Table 3-6 PCR primers used for the amplification archaeal and bacterial *amoA* gene

Primer	Target	Sequence (5' - 3')	Reference
Arch-amoAF	Archaeal	STAATGGTCTGGCTTAGACG	Francis et al., 2005
Arch-amoAR	<i>amoA</i> gene	GCGGCCATCCATCTGTATGT	
amoA-1F	bacterial	GGGGTTTCTACTGGTGGT	Rotthauwe et al., 1997
amoA-2R	<i>amoA</i> gene	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	

Table 3-7 Reagents for PCR reaction

Reagents	Volume(μ l)	Concentration	Final concentration
Master Mix	10	-	-
Primer - Forward	1	10 μ M	0.5 μ M
Primer - Reverse	1	10 μ M	0.5 μ M
Template DNA	2	-	-
Deionized water	6	-	-

Table 3-8 Thermocycling for PCR reaction

Thermocycling	Arch-amoAF/Arch-amoAR			amoA-1F/amoA-2R		
	temp.(°C)	time	cycle	temp.(°C)	time	cycle
Initialization	94	7 min	-	94	7 min	-
Denaturation	94	45 sec		94	30 sec	
Annealing	53	45 sec	30	55	30 sec	30
Extension	72	45 sec		72	30 sec	
Final elongation	72	7 min	-	72	7 min	-
Final hold	4	∞	-	4	∞	-

Table 3-9 Reagents for Cloning

Reagents	Volume(μl)
Ligation Buffer A	1
Ligation Buffer B	1
T&ATM cloning vector	2
PCR product	2
yT4 DNA ligase	1
Deionized water	3

Table 3-10 Medium and blue white screen in cloning procedures

Solution	Addition	Final Volume	Store Temp.	Brand
	Lysogeny broth, 5 g			BD
LB medium	Agar, 3 g	200 ml (Water)	4 °C	BD
	Antibiotic, 40 µl			Sigma
Antibiotic	Ampicillin 0.1 g	1 ml (Water)	4 °C	Sigma
Blue white screen	X-gal, 0.04 g	1 ml (DMF)	-20 °C	GeneMark
	IPTG, 0.024 g	1 ml (Water)	-20 °C	GeneMark

Table 3-11 Reagents for colony PCR

Reagents	Volume(µl)	Concentration	Final concentration
Master Mix	12.5	-	-
M13-F	1	10 µM	0.4 µM
M13-R	1	10 µM	0.4 µM
Deionized water	10.5	-	-

Table 3-12 Thermocycling for colony PCR reaction

Thermocycling	M13-F/M13-R		
	temp.(°C)	time	cycle
Initialization	94	5 min	-
Denaturation	94	30 sec	
Annealing	53	30 sec	25
Extension	72	30** sec	
Final elongation	72	7 min	-
Final hold	4	∞	-

** General, DNA polymerase can synthesize 1Kb of DNA in 1 min.

Table 3-13 Reagents for real-time PCR

Reagents	Volume(μ l)	Concentration	Final concentration
GM SYBR green	12.5	-	-
Primer - Forward	1	10 μ M	0.5 μ M
Primer - Reverse	1	10 μ M	0.5 μ M
Template DNA	2	-	-
Deionized water	10.5	-	-

Table 3-14 Thermocycling for real-time PCR reaction

Thermocycling	Arch-amoAF/Arch-amoAR				amoA-1F/amoA-2R			
	temp.($^{\circ}$ C)	time	cycle	detection	temp.($^{\circ}$ C)	time	cycle	detection
Initialization	94	7 min	-		94	7 min	-	
Denaturation	94	45 sec			94	30 sec		
Annealing	53	45 sec	45		55	30 sec	45	
Extension	72	45 sec		✓	72	30 sec		✓

Table 4-1 Soil properties of Changhua estuary sediment sample in February

sites	pH	Water	PNR	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	TOC
		content wt %	mg/kg/day	mg/kg	μg/kg	mg/kg	g/kg
CH01	7.51	19.09	0.78	15.25	82.72	3.73	3.22
CH02	8.02	20.95	0.29	1.41	68.67	8.94	2.69
CH03	8.33	19.20	1.21	8.73	63.40	5.80	1.74
CH04	7.49	38.48	0.22	1.23	44.08	12.55	6.86
CH05	7.78	38.58	0.38	0.36	42.33	9.08	6.41
CH06	7.86	38.11	0.41	0.54	26.52	14.58	2.57
CH07	7.81	23.18	0.24	3.84	63.40	5.80	2.90
CH08	8.26	25.99	0.34	0.87	59.89	7.74	13.16
CH09	8.36	30.74	0.18	4.85	65.16	3.65	1.14
CH10	8.32	28.16	0.31	8.19	63.40	2.89	3.75
CH11	8.01	34.91	0.39	4.57	68.67	3.01	4.44
CH12	8.62	28.52	0.49	8.59	128.39	2.31	2.20

*PNR: Potential Nitrification Rate(NO₂⁻ mg/soil kg/day)

Table 4-2 Correlationship between various environmental factors in February

Correlation coefficient Significance	pH	water content	PNR	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	TOC
pH	1						
water content	-0.197 0.54	1					
PNR	0.108 0.74	-0.503 0.10	1				
NH ₄ ⁺	0.116 0.72	-0.584* 0.05	0.592* 0.04	1			
NO ₂ ⁻	0.513 0.09	-0.442 0.15	0.193 0.55	0.609* 0.04	1		
NO ₃ ⁻	-0.516 0.09	0.445 0.15	-0.186 0.56	-0.694* 0.01	-0.743** 0.01	1	
TOC	-0.148 0.65	0.202 0.53	-0.244 0.44	-0.427 0.17	-0.256 0.42	0.271 0.39	1

*Correlation is significant at the 0.05 level

**Correlation is significant at the 0.01 level

Table 4-3 Correlationship between environmental factors and ammonia oxidizer in February

Correlation coefficient Significance	pH	water content	PNR	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	TOC
AOA <i>amoA</i>	0.231	-0.413	0.738**	0.589*	0.257	-0.330	0.020
	0.47	0.18	0.01	0.04	0.42	0.29	0.95
AOB <i>amoA</i>	-0.303	-0.246	0.350	0.739**	0.448	-0.473	-0.255
	0.34	0.44	0.27	0.01	0.14	0.12	0.42

*Correlation is significant at the 0.05 level

**Correlation is significant at the 0.01 level

Table 4-4 Soil properties of estuary sediment sample in October

sites	pH	water content wt %	PNR mg/kg/day	Ammonium mg/kg	Nitrite µg/kg	Nirtate mg/kg	Salinity psu
CH01	8.12 (0.61)	22.90 (3.82)	1.70 (0.93)	5.83 (-9.42)	67.29 (-15.43)	3.63 (-0.10)	3.95
CH05	7.99 (0.21)	38.25 (-0.33)	0.35 (-0.03)	0.44 (0.08)	68.19 (25.86)	19.68 (14.25)	2.23
CH09	8.48 (0.12)	31.90 (1.15)	0.48 (0.3)	3.55 (-1.30)	87.15 (21.99)	5.41 (-0.74)	5.35
CH12	8.61 (-0.01)	30.31 (1.79)	0.44 (-0.06)	3.95 (-4.64)	143.00 (14.61)	3.84 (-2.16)	4.86

*The number of brackets indicates the change compared with first sampling.

Table 4-5 Arachaeal *amoA* gene diversity in different sites sampled in October

	Seq numbers	OTUs numbers of AOA	Chao 1 estimeat	Shannon index	Simpson Inv index
CH01	11	5	5.3	1.41	3.46
CH05	18	12	15.97	2.4	10.13
CH09	18	7	9.83	1.53	3.31
CH12	17	6	6.94	1.32	2.6

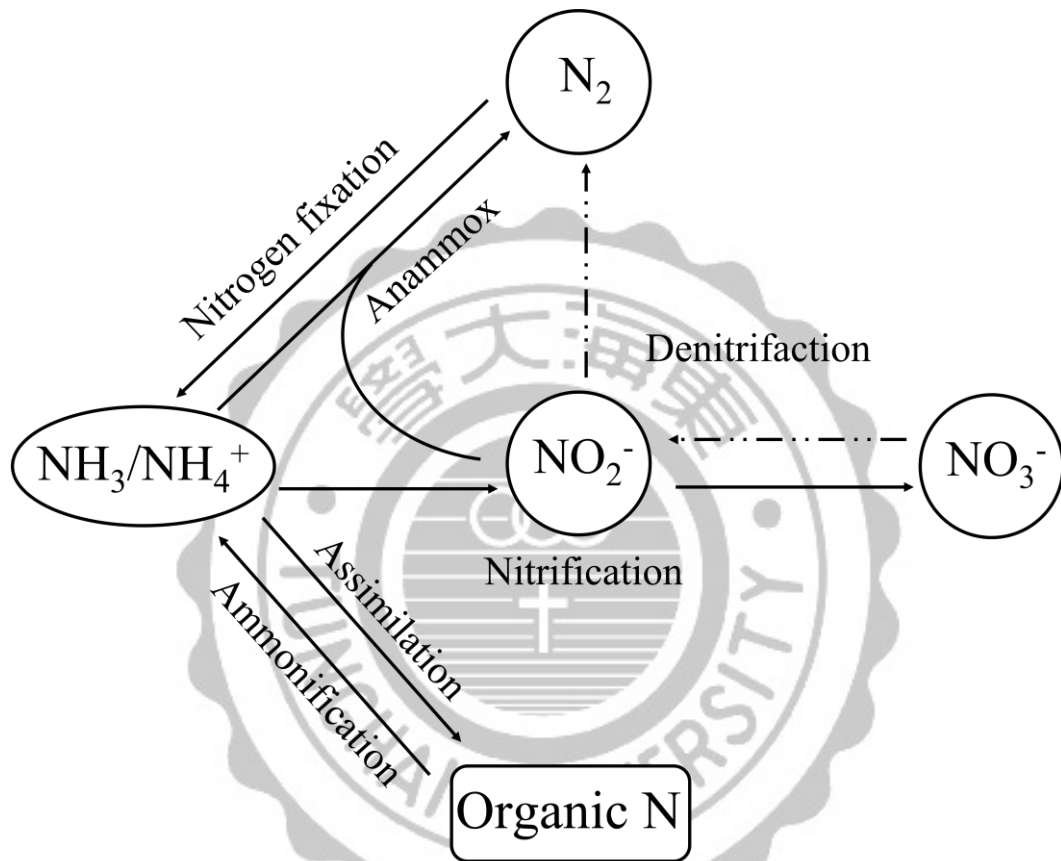


Fig 2-1 Nitrogen cycle. The cycle between various microbial-driven processes including nitrogen fixation, nitrification, denitrification, assimilation, ammonification and anaerobic ammonia oxidation, also known as Anammox.

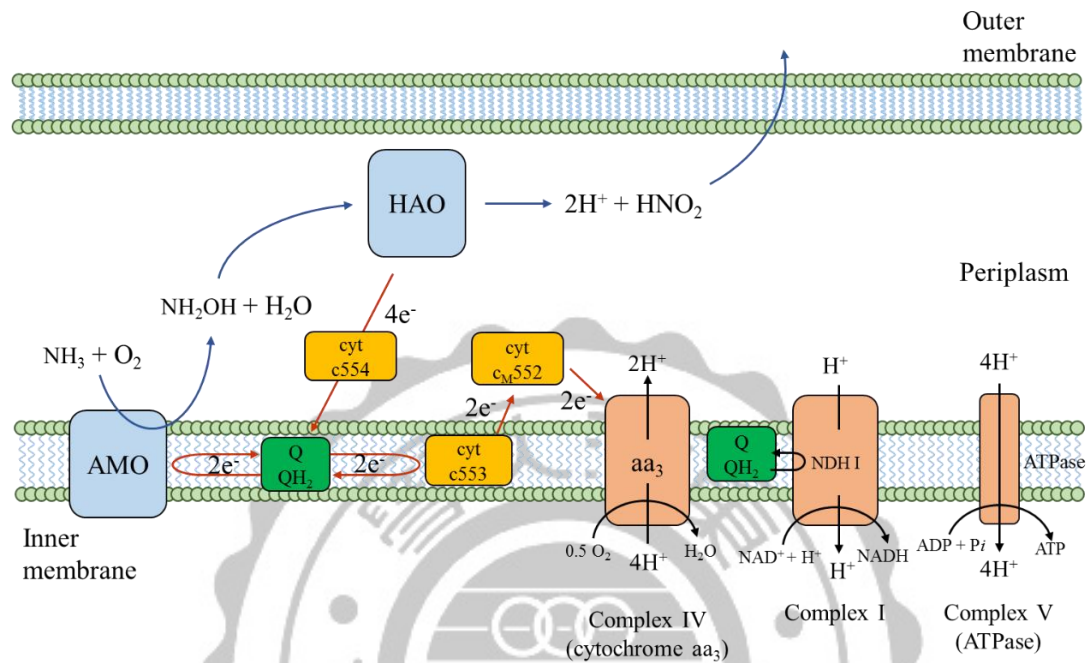


Fig 2-2 Respiratory pathway for ammonia oxidation in AOB (*Nitrosomonas europaea*). Ammonia is oxidized to NH_2OH by the membrane enzyme ammonia monooxygenase. In the periplasm, hydroxylamine is oxidized to nitrite by hydroxylamine oxidoreductase. Then, four electrons are transferred to the quinone pool by cytochrome c_{554} . Subsequently, two electrons return to ammonia monooxygenase and are required to initiate ammonia oxidation. By cytochrome c_{553} and cytochrome c_{M552} , two remaining electrons enter the electron transport chain to generate the proton motive force necessary for ATP synthesis. (Stahl and de la Torre, 2012)

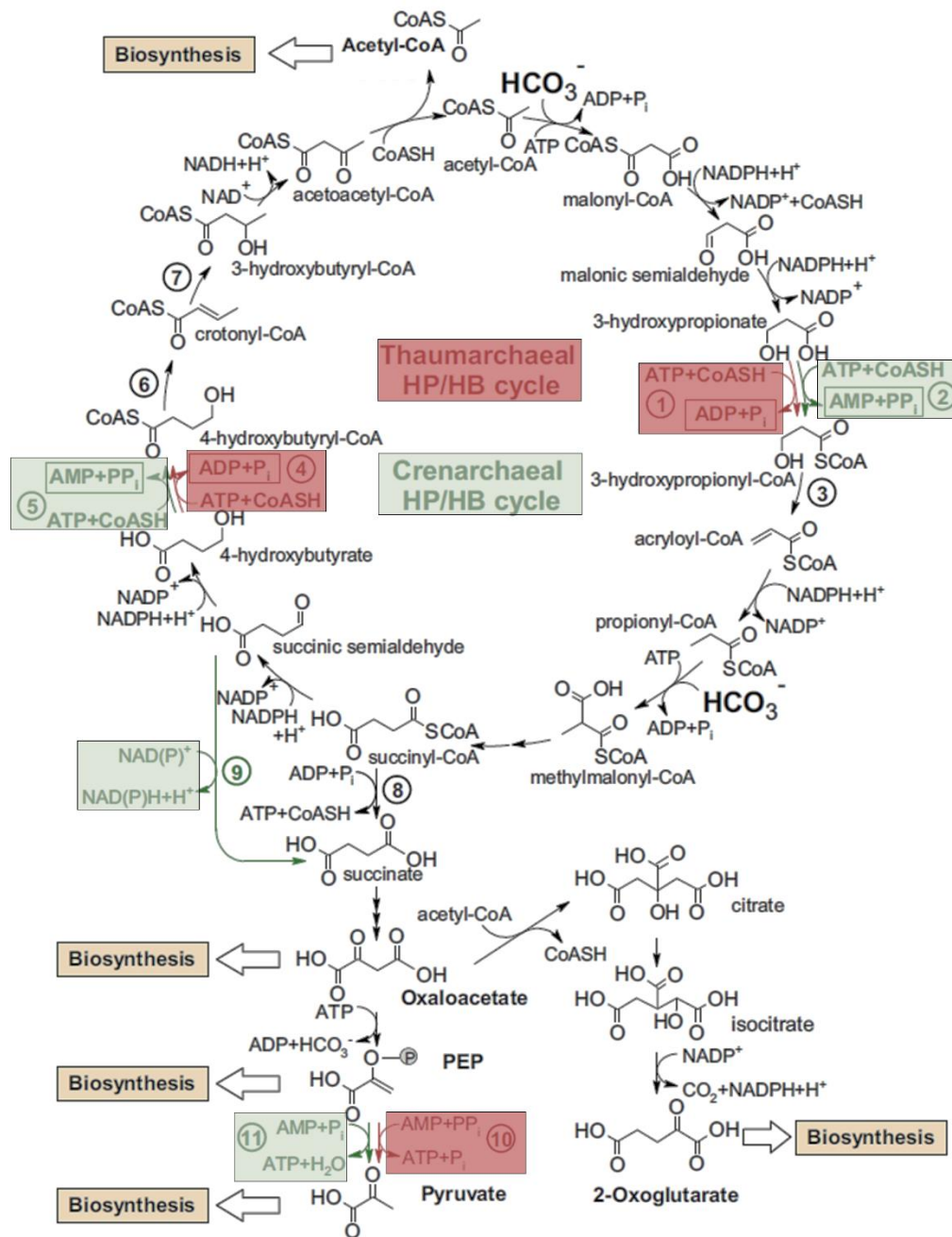


Fig 2-3 HP/HB cycle of crenarchaeal and thaumarchaeal. ①, 3-hydroxypropionyl-CoA synthetase (ADP-forming); ②, 3-hydroxypropionyl-CoA synthetase (AMP-forming); ③, 3-hydroxypropionyl-CoA dehydratase; ④, 4-hydroxybutyryl-CoA synthetase (ADP-forming); ⑤, 4-hydroxybutyryl-CoA synthetase (AMP-forming); ⑥, 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase; ⑦, crotonyl-CoA hydratase; ⑧, succinyl-CoA synthetase (ADP-forming); ⑨, succinic semialdehyde dehydrogenase; ⑩, pyruvate-phosphate dikinase; ⑪, pyruvate-water dikinase. (Könneke *et al.*, 2014)

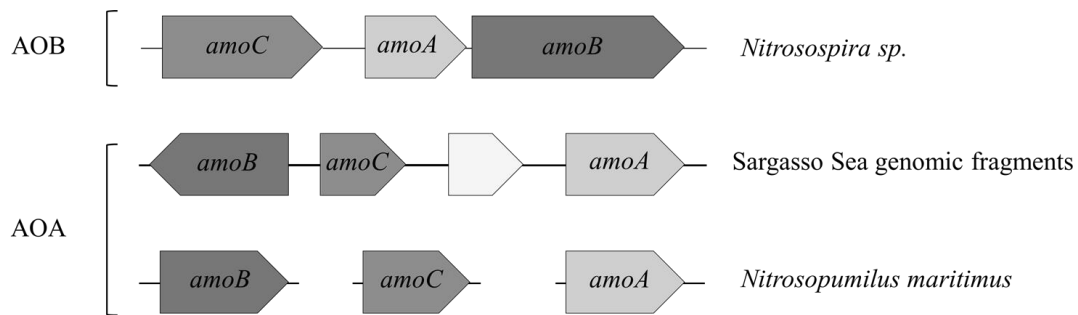


Fig 2-4 Schematic of ammonia monooxygenase of archaea and bacteria. The AOB genes with a conserved amo operon arrangement, but amo clusters in AOA gene varies. In addition, the AOA gene clusters contain a gene between *amoA* and *amoB* that encodes a protein of unknown function.

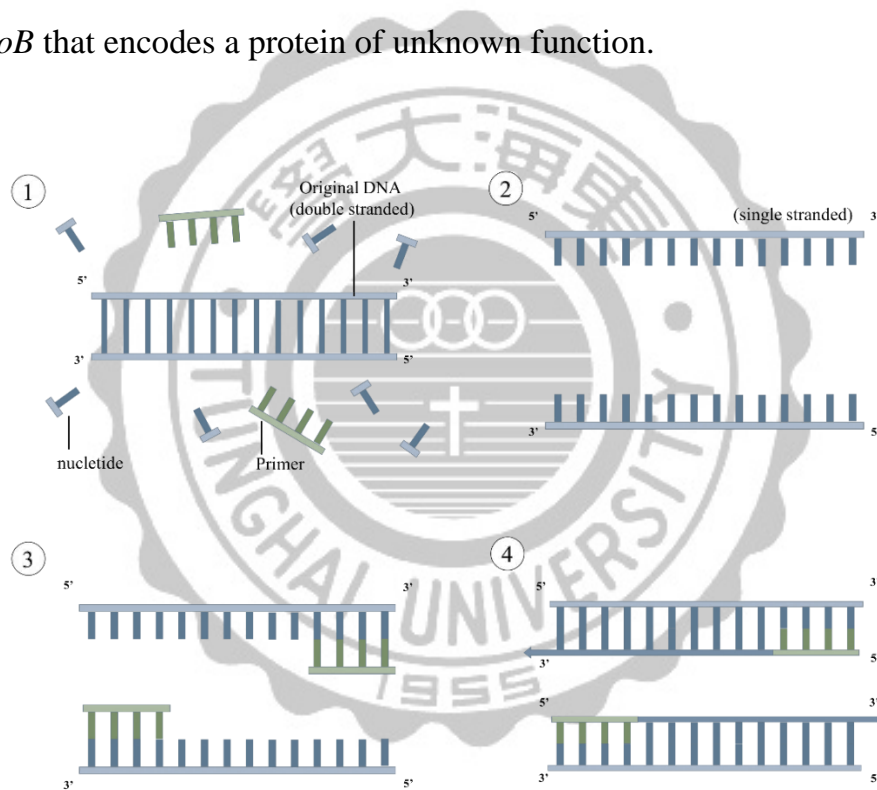


Fig 2-5 Schematic of polymerase chain reaction. ① Reagent contains DNA template, primers, DNA polymerase, dNTP and buffer solution, providing a suitable chemical environment. ② Heating the reaction to 94 - 98°C for DNA melting. ③ The reaction temperature is lowered to 50 - 65°C allowing annealing of the primers to the single-stranded DNA template. ④ Heating the reaction to 72°C for the DNA polymerase synthesizes a new DNA strand complementary to the DNA template.

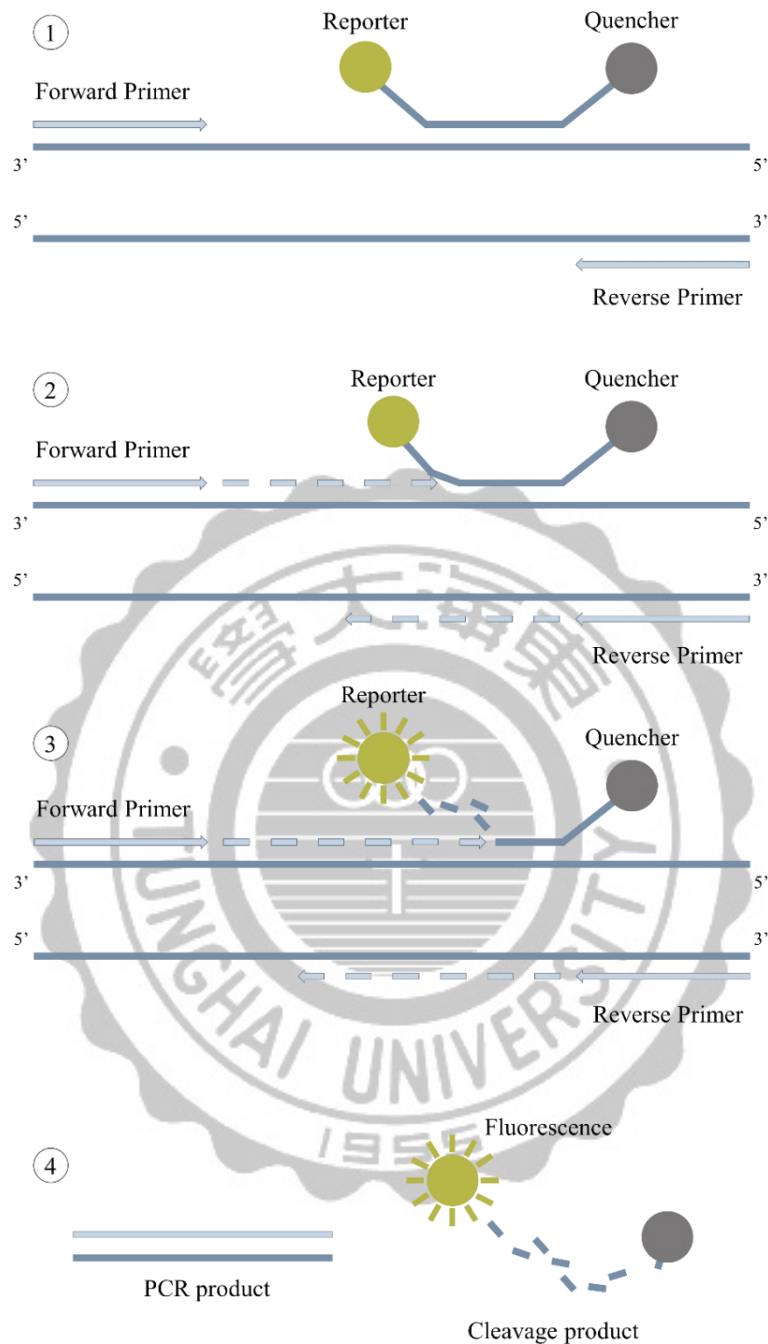


Fig 2-6 Schematic of real-time polymerase chain reaction (TaqMan). ① Probes binds to template DNA, reporter fluorescence is quenched in intact probes. ② DNA began to extend during PCR process. ③ During PCR, the DNA polymerase degrades the probe and the fluorescent reporter released. ④ After several cycles, the gradual accumulation of fluorescence intensity, and

proportional to PCR product.

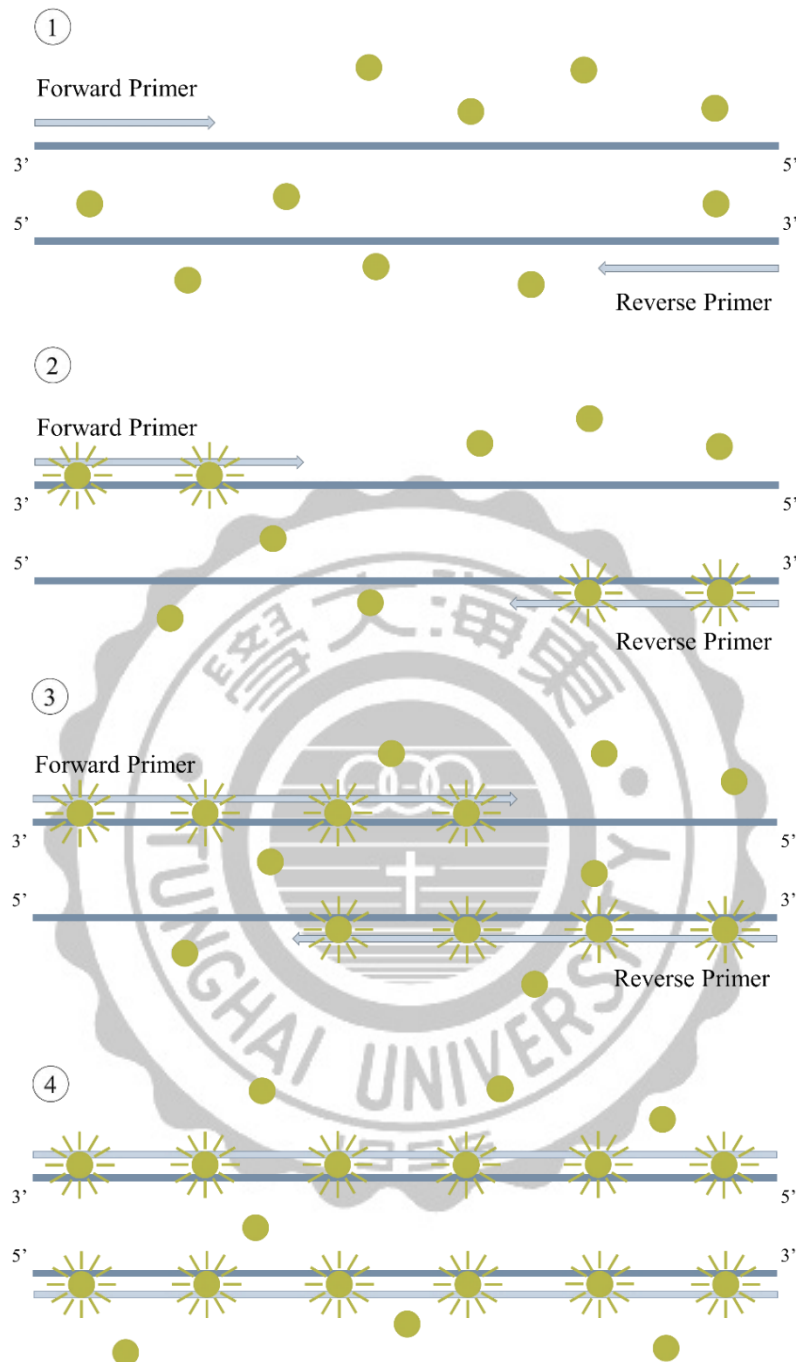


Fig 2-7 Schematic of real-time polymerase chain reaction (Sybr Green). ① When the template DNA melting, fluorochromes wouldn't binds to single-stranded DNA, no detectable fluorescence. ②DNA began to extend during PCR process. ③ The fluorochromes binds to double-stranded DNA, causing fluorescence of the dye. ④After several cycles, the gradual accumulation of fluorescence intensity, and proportional to PCR product.

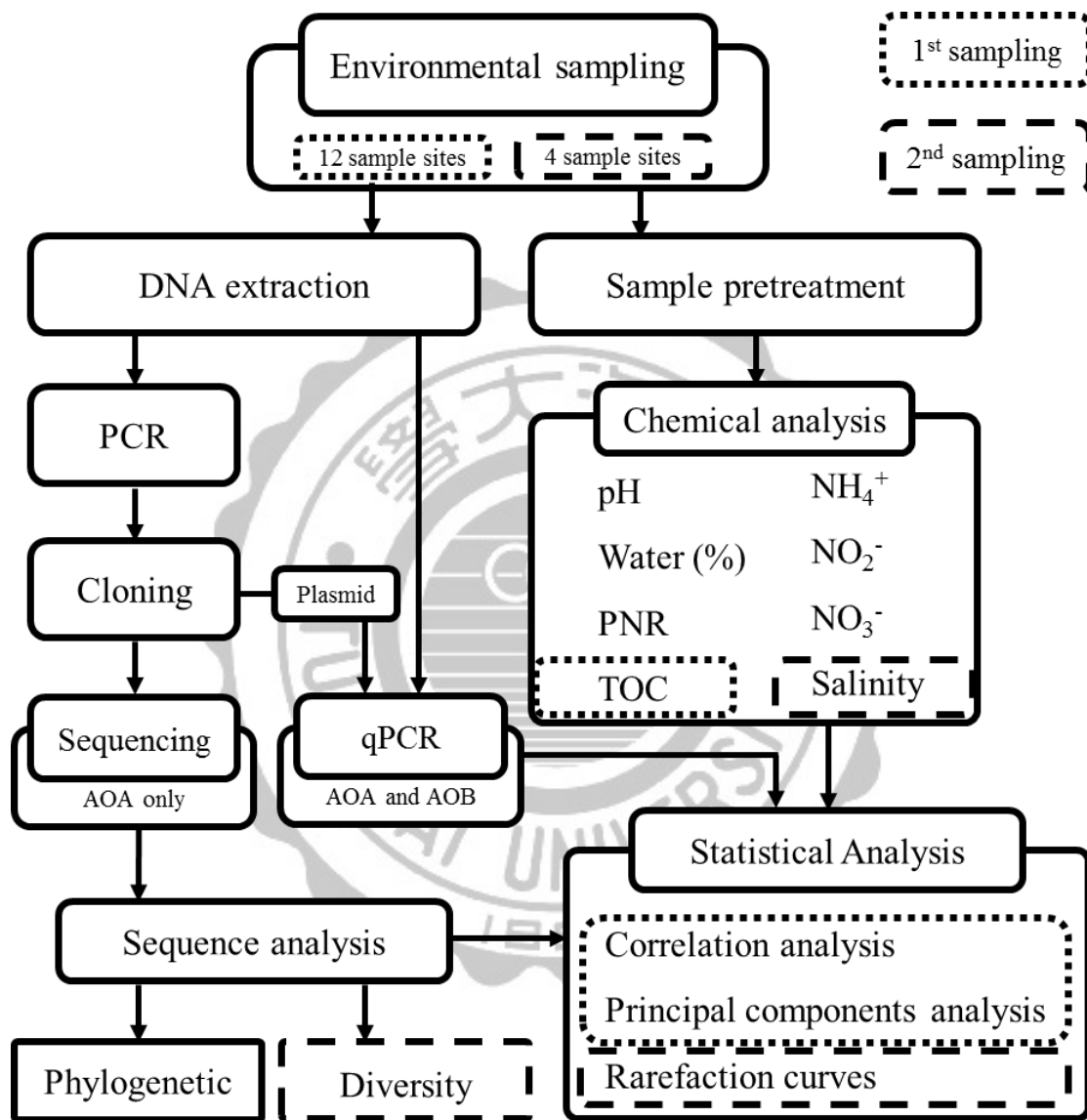


Fig 3-1 Flowchart of experimental design

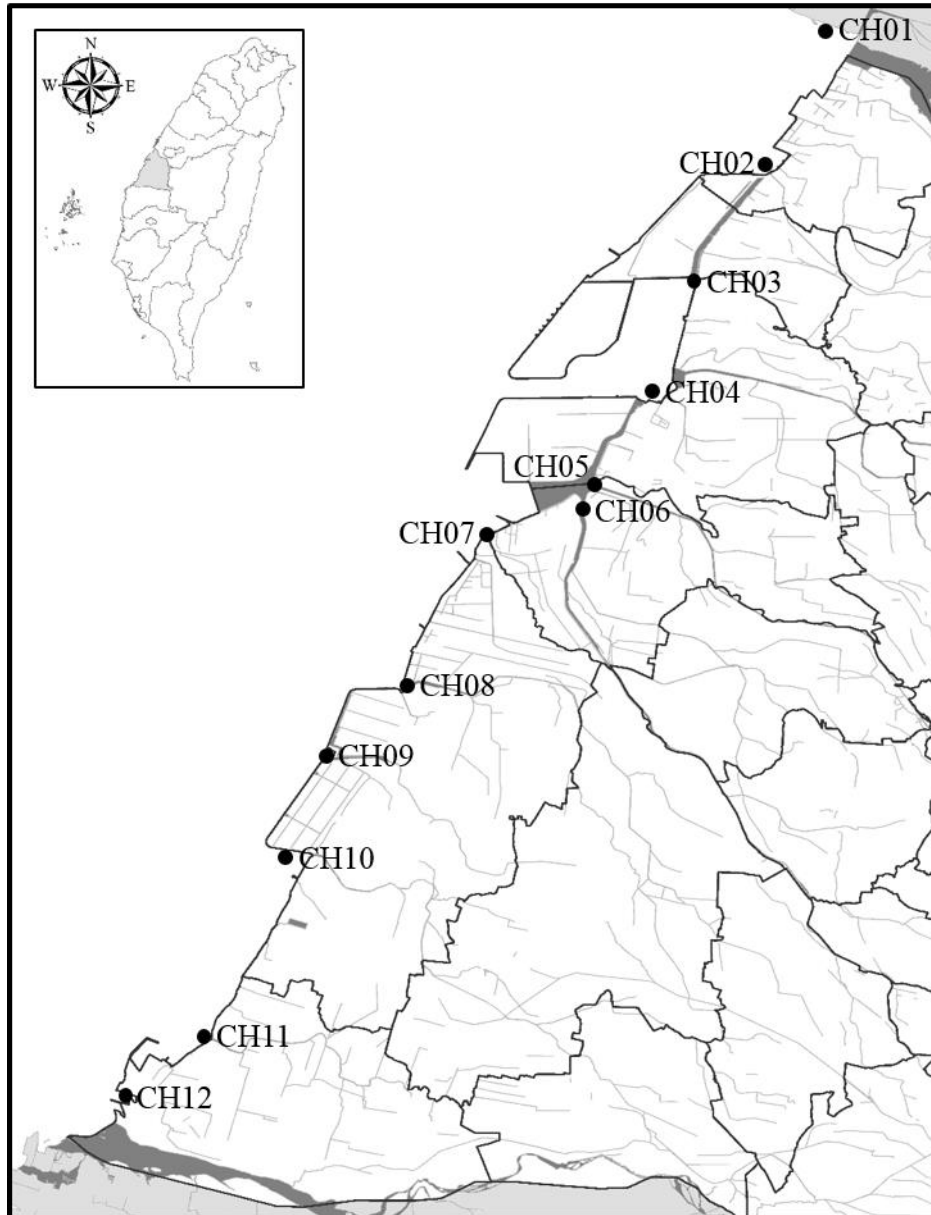


Fig 3-2 Location of the study sites in Changhua coastal. CH01: Estuary of Dadu River; CH02: Estuary of Tianwei Drainage; CH03: Estuary of Fan Ya Drainage; CH04: Estuary of Yang Tsai River; CH05: Estuary of Yuanlin Drainage; CH06: Estuary of older Zhuoshui River; CH07: Estuary of Hanbao River; CH08 : Estuary of Wanxing Drainage; CH09: Estuary of Hougang River; CH10: Estuary of Erlin River; CH11: Estuary of Yuliao River; CH12: Estuary of Zhuoshui River north shore.

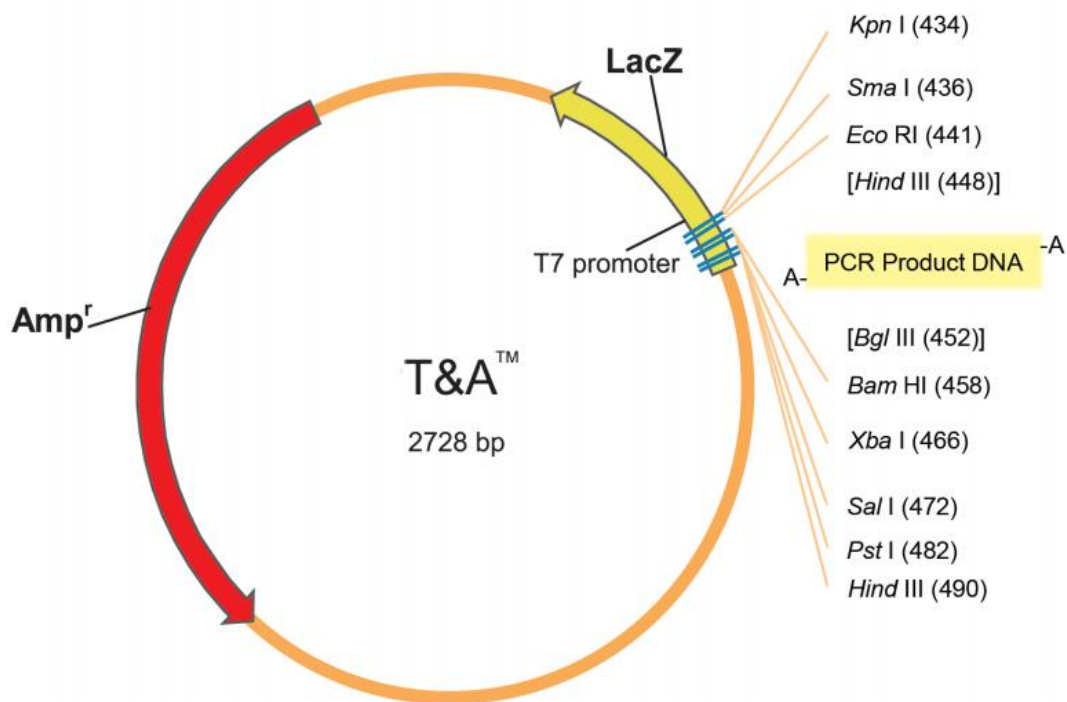


Fig 3-3 Schematic and sequence points of T&A™ Cloning Vector

301	TACGCCAGCT	GGCGAAAGGG	GGATGTGCTG	CAAGGCGATT	AAGTTGGGTA	
	ATGCGGTGCGA	CCGCTTTCCC	CCTACACGAC	GTTCCGCTAA	TTCAACCCAT	
	M13 Forward Primer					
351	ACGCCAGGGT	TTTCCCAGTC	ACGACGTTGT	AAAACGACGG	CCAGTGAATT	
	TGCGGTCCCA	AAAGGGTCAG	TGCTGCAACA	TTTTGCTGCC	GGTCACTTAA	
	T7 Promoter					
401	GTAATACGAC	TCACTATAGG	GCGAGCTCGG	TACCCGGGCG	AATTCCAAGC	
	CATTATGCTG	AGTGATATCC	CGCTCGAGCC	ATGGGCCCGC	TTAAGGTTCG	
		<i>Bgl</i> II	<i>Bam</i> HI	<i>Xba</i> I	<i>Sal</i> I	<i>Pst</i> I
451	TT	AGATCTGGAT	CCCCTCTAGA	GTCGACCTGC	AGGCATGCAA	
	AA	TCTAGACCTA	GGGGAGATCT	CAGCTGGACG	TCCGTACGTT	
	<i>Hind</i> III					
493	CGTTGGCGTA	ATCATGGTCA	TAGCTGTTTC	CTGTGTGAAA	TTGTTATCCG	
	GCAACCGCAT	TAGTACCAGT	ATCGACAAAG	GACACACTTT	AACAATAGGC	
			M13 Reverse Primer			

Fig 3-4 DNA sequence of cloning region in T&A™ Cloning Vector

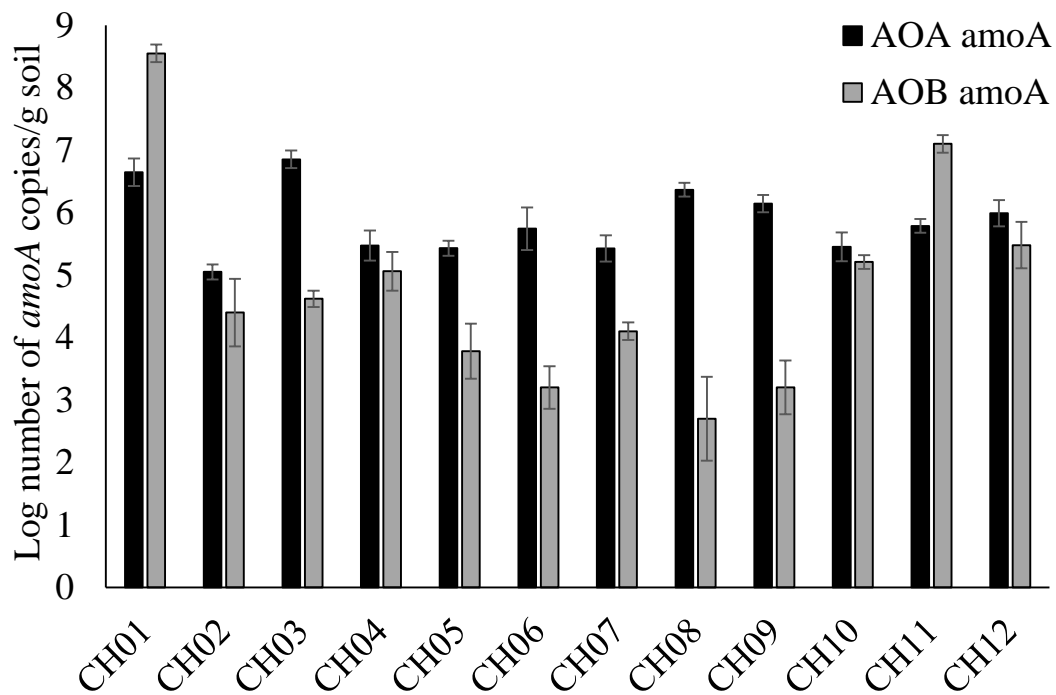


Fig 4-1 Abundance of archaeal and bacterial *amoA* gene copy numbers in Changhua estuary sediment in February. *Error bars* represent the standard deviation of triplicate samples.



Fig 4-2 Maximum-likelihood phylogenetic tree of ammonia oxidizing archaea *amoA* based on OTUs sequences in February. Scale bar represents the 5% nucleotide substitution. The numbers on the branch nodes indicate the percentages of bootstrap support for the clades based on 500 bootstrap resampling. Numbers in the brackets are the number of sequences obtained in this study in February.

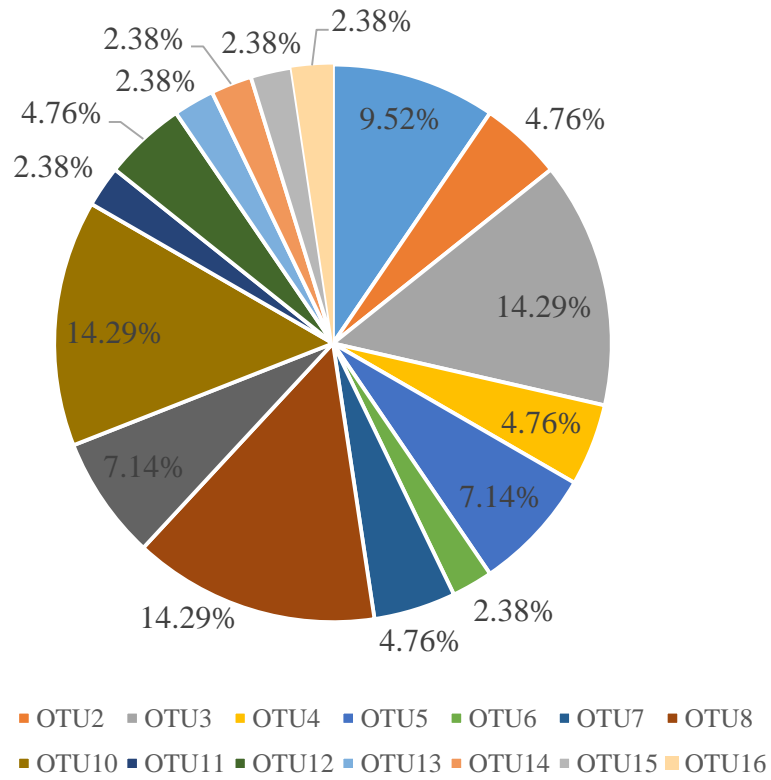


Fig 4-3 Relative abundance of archaeal *amoA* gene OTUs in February. The *amoA* gene sequences having similarity $\geq 95\%$ were considered to be the same OTU.

Sequence samples obtained from entire area.

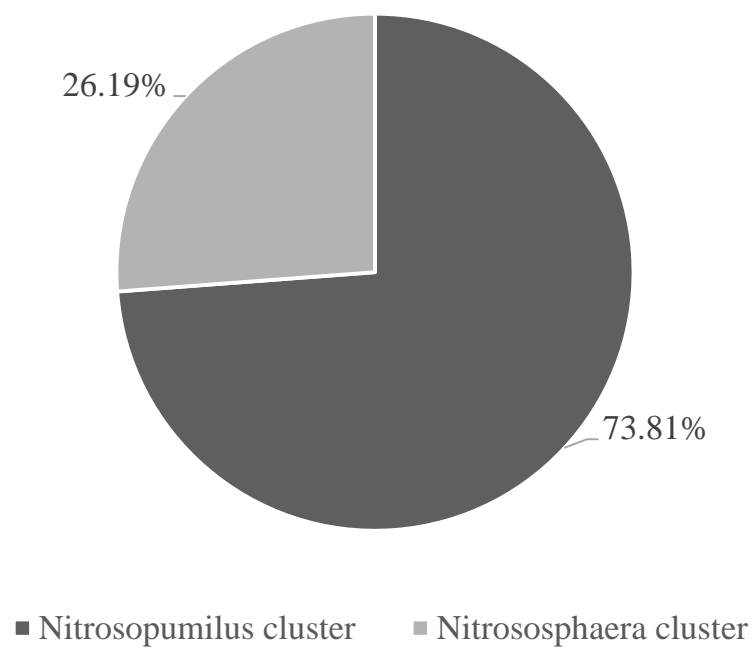


Fig 4-4 Relative abundance of phylogenetic AOA groups in February. Sequence samples obtained from entire area.

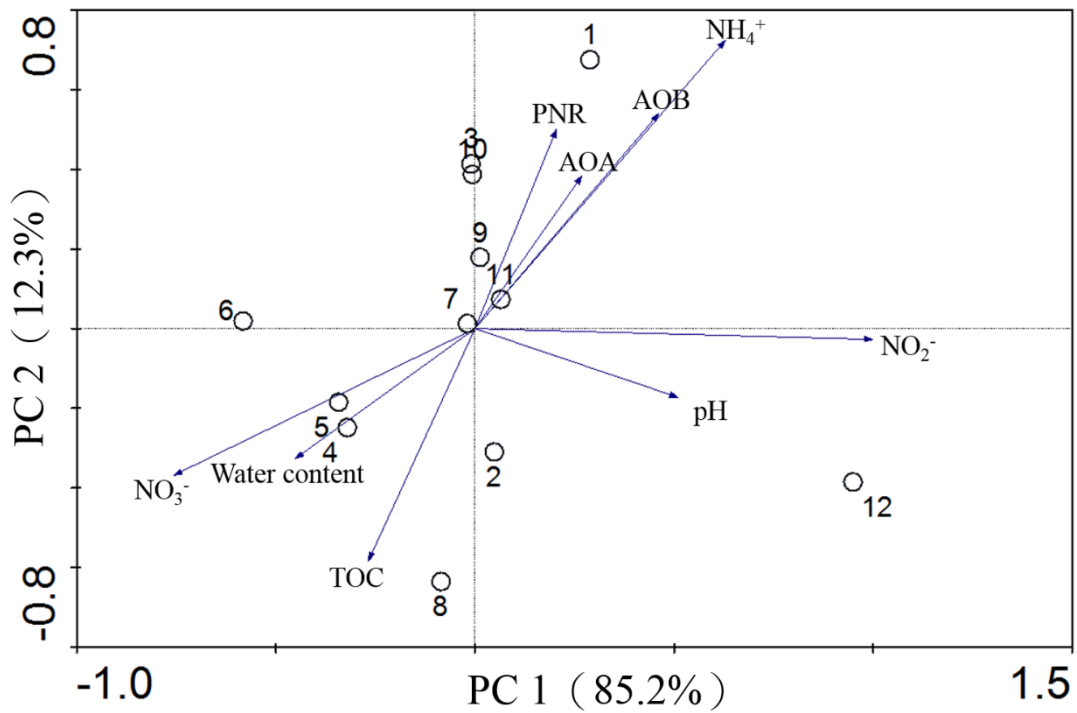


Fig 4-5 Principal component analysis integrating variables measured for all regions across entire Changhua estuary sample sites. Circles represent different sample sites. Arrows represent different variables.

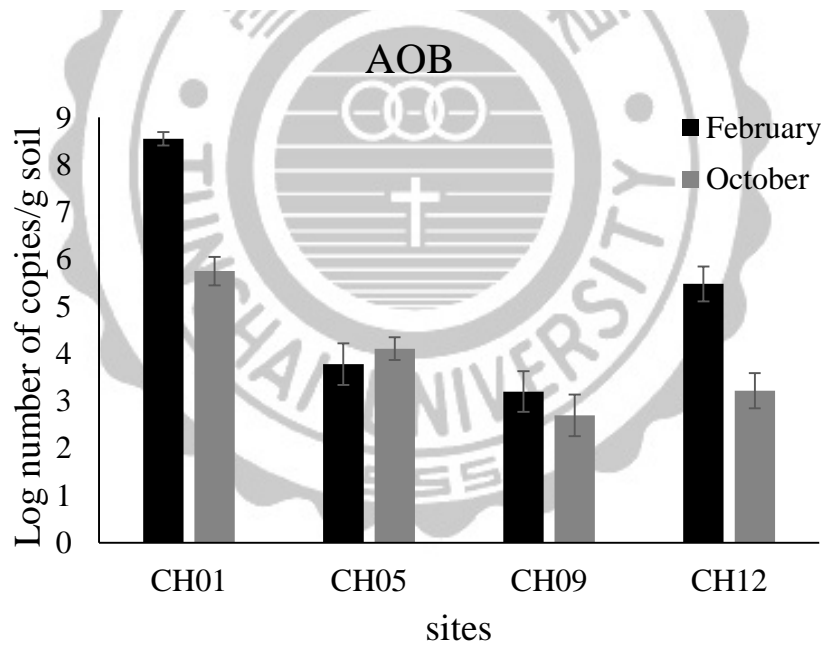
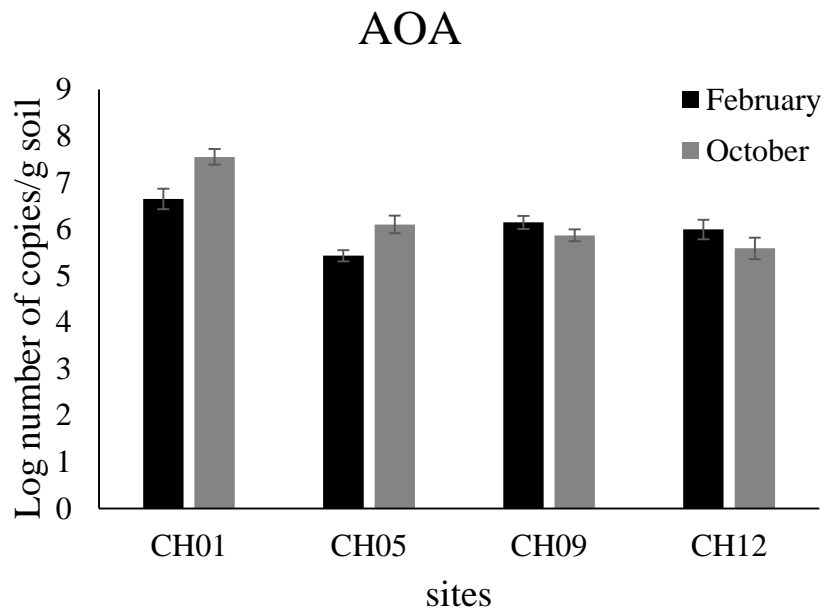


Fig 4-6 Comparison abundance of archaeal and bacterial *amoA* gene copy numbers in Changhua estuary between different months. Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

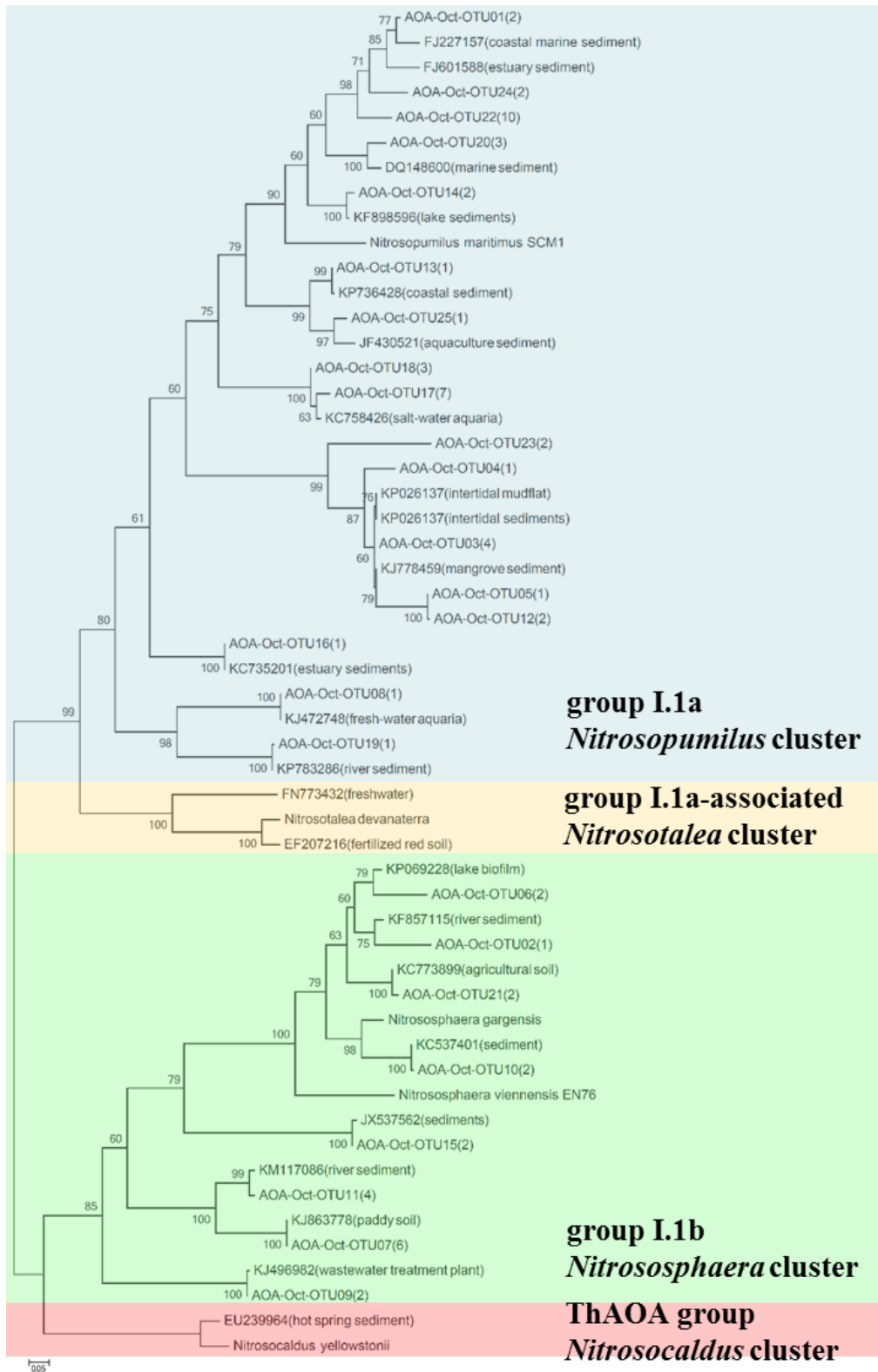


Fig 4-7 Maximum-likelihood phylogenetic tree of ammonia oxidizing archaea *amoA* based on OTUs sequences in October. Scale bar represents the 5% nucleotide substitution.

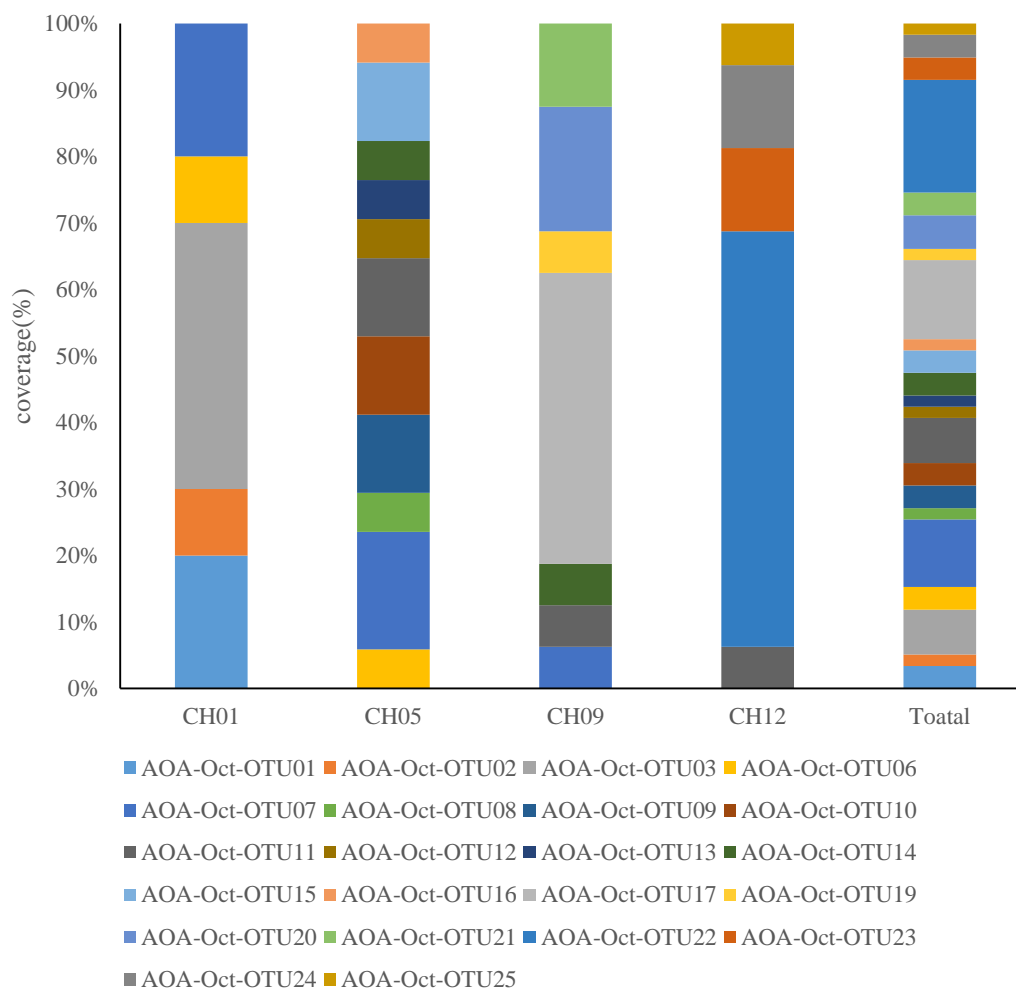


Fig 4-8 Relative abundance of archaeal *amoA* gene OTUs in October. The *amoA* gene sequences having similarity $\geq 95\%$ were considered to be the same OTU.

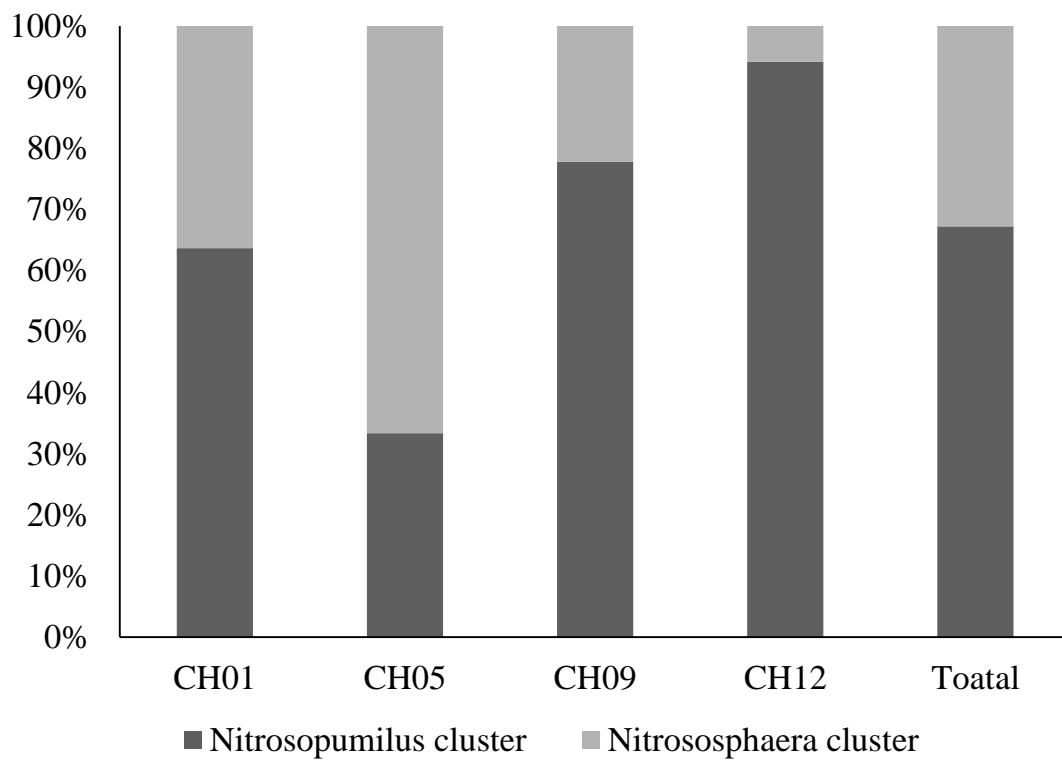


Fig 4-9 Relative abundance of AOA groups in October. Sequence samples obtained from four sample sites.

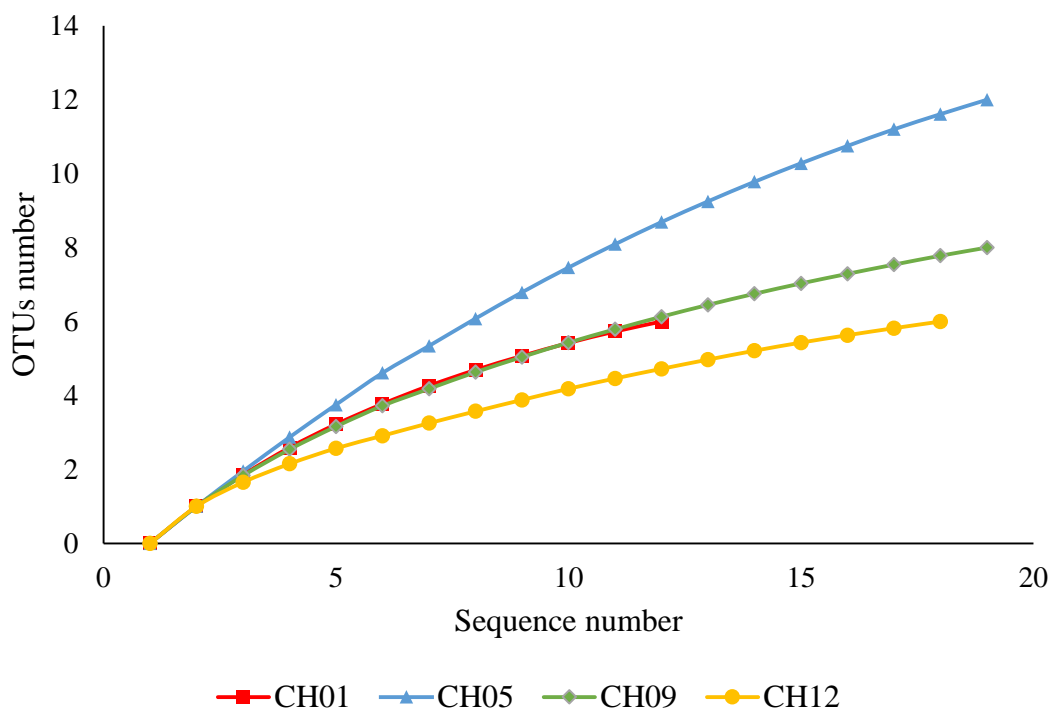


Fig 4-10 Rarefaction curves of operational taxonomic units of ammonia oxidizing archaea. Derived from archaeal *amoA* gene sequences from the sediment sample of Changhua estuary in October.

參考文獻

- Berg, I. A., Kockelkorn, D., Buckel, W., Fuchs, G. (2007) A 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in archaea. *Science* 318: 1782–1786.
- Bernhard, A. E., Landry, Z. C., Blevins, A., de la Torre, J. R., Giblin, A. E., Stahl, D. A (2010) Abundance of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria along an Estuarine Salinity Gradient in Relation to Potential Nitrification Rates. *Appl Environ Microbiol.* 76(4):1285-9.
- Bollmann, A., French, E., Laanbroek, H. J. (2011) Isolation, Cultivation, and Characterization of Ammonia- Oxidizing Bacteria and Archaea Adapted to Low Ammonium Concentrations *Methods in Enzymology*, Volume 486.
- Chen, Y. L., Xu, Z. W., Hu, H. W., Hu, Y. J., Hao, Z. P., Jiang, Y., Chen, B. (2013) Responses of ammonia-oxidizing bacteria and archaea to nitrogen fertilization and precipitation increment in a typical temperate steppe in Inner Mongolia. *Appl Soil Ecol* 68: 36–45.
- Erguder, T. H., Boon, N., Wittebolle, L., Marzorati, M., Verstraete, W. (2009) Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea *FEMS Microbiology Reviews* Vol 33, Issue 5, pages 855–869
- Francis, C. A., Roberts, K. J., Beman, J. M., Santoro, A. E., Oakley, B. B. (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing Archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 14683-14688.
- Gao, J. F., Luo, X., Wu, G. X., Li, T., Peng, Y. Z. (2013) Quantitative analyses of the composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in eight full-scale biological wastewater treatment plants. *Bioresour Technol.* 138:285-96.
- Hatzenpichler, R., Lebedeva, E. V., Spieck, E., Stoecker, K., Richter, A., Daims,

- H., Wagner, M. (2008) A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring Proc Natl Acad Sci USA. 12; 105(6): 2134–2139.
- He, J. Z., Shen, J. P., Zhang, L. M., Zhu, Y. G., Zheng, Y. M., Xu, M. G., Di, H. (2007) Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammoniaoxidizing archaea of a Chinese upland red soil under longterm fertilization practices. Environ Microbiol 9: 2364–2374
- Head, I. M., Hiorns, W. D., Embley, T. M., McCarthy, A. J., Saunders, J. R. (1993) The phylogeny of autotrophic ammoniaoxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. J. Gen. Microbiol. 139: 1147–1153.
- Honda, N., Hirai, M., Ano, T., Shoda, M. (1998) Antifungal effect of a heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. Biochem. Lett. 20:703-705.
- Jung, M. Y., Park, S. J., Min, D., Kim, J. S., Rijpstra, W. I. C., Sinnighe Damsté, J. S. , Kim, G. J., Madsen, Eugene L., Rhee, S. K. (2011) Enrichment and Characterization of an Autotrophic Ammonia-Oxidizing Archaeon of Mesophilic Crenarchaeal Group I.1a from an Agricultural Soil Appl. Environ. Microbiol. vol. 77 no. 24 8635-8647.
- Kalanetra, K. M., Bano, N., Hollibaugh, J. T. (2009) Ammonia-oxidizing Archaea in the Arctic Ocean and Antarctic coastal waters. Environ Microbiol. 11(9):2434-45.
- Kandeler, E., Gerber, H. (1988) Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. Biol. Fertil. Soils 6, 68–72.
- Könneke, M., Bernhard, A. E., de la Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B., Stahl, D. A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine

- archaeon. *Nature* Sep 22;437(7058):543-6.
- Könneke, M., Schubert, D. M., Brown, P. C., Hügler, M., Standfest, S., Schwander, T., von Borzyskowski, L. S., Erb, T. J., Stahl, D. A., Berg, I. A. (2014) Ammonia-oxidizing archaea use the most energy-efficient aerobic pathway for CO₂ fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 8239–8244.
- Kuenen, J. G., Robertson, L. A. (1994) Combined nitrification-denitrification processes. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 109-117.
- Lehtovirta-Morley, L. E., Stoecker, K., Vilcinskis, A., Prosser, J. I., Nicol, G. W. (2011) Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proc Natl Acad Sci USA.* 20;108(38):15892-7.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, C., Schleper, C. (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442, 806-809.
- Li, J., Nedwell, D. B., Beddow, J., Dumbrell, A. J., McKew, B. A., Thorpe, E. L., Whitby, C. (2015) *amoA* gene abundances and nitrification potential rates suggest that benthic ammonia-oxidizing bacteria (AOB) not archaea (AOA) dominate N cycling in the Colne estuary, UK. *Appl Environ Microbiol.* 81(1):159-65.
- Liu, J., Wu, W., Ding, Y., Shi, D., Chen, Y. (2010) Ammonia-oxidizing archaea and their important roles in nitrogen biogeochemical cycling: A review. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 21(8): 2154-2160.
- Martens-Habbena, W., Berube, P. M., Urakawa, H., de la Torre, J. R., Stahl, D. A. (2009) Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature*.15;461(7266):976-9.
- McCaig, A. E., T. M. Embley, Prosser, J. I. (1989) Molecular analysis enrichment cultures of marine oxidisers. *FEMS Micobiol. Lett.* 120:363-368.

- McCarthy, G. W. (1999) Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol Fertil Soils* 29:1–9.
- Mincer, T. J., Church, M. J., Taylor, L. T., Preston, C., Karl, D. M., DeLong, E. F. (2007) Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. *Environ Microbiol*; 9(5):1162-75.
- Moin, N. S., Nelson, K. A., Bush, A., Bernhard, A. E. (2009) Distribution and diversity of archaeal and bacterial ammonia oxidizers in salt marsh sediments. *Appl Environ Microbiol.* 75(23):7461-8.
- Mosier, A. C., Francis, C. A. (2008) Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay estuary. *Environ Microbiol.* 10(11):3002-16.
- Mosier, A. C., Lund, M. B., Francis, C.A. (2012) Ecophysiology of an ammonia-oxidizing archaeon adapted to low-salinity habitats. *Microb Ecol.* 64(4):955-63.
- Mußmann, M, Brito, I., Pitcher, A., Sinnighe Damsté, J. S., Hatzenpichler, R., Richter, A.,Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., Müller, A., Daims, H., Wagner, M., Head, I. M. (2011) Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express *amoA* but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 16771-16776.
- Nakagawa, T., Mori, K., Kato, C., Takahashi, R., Tokuyama, T. (2007) Distribution of Cold-Adapted Ammonia-Oxidizing Microorganisms in the Deep-Ocean of the Northeastern Japan Sea. *Microbes and Environments*, 22: 365-372.
- Nicol, G. W., Schleper, C. (2006) Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends Microbiol.* 14(5):207-12.

- Park, B. J., Park, S. J., Yoon, D. N., SchOTUen, S., Sinninghe Damsté, J. S., Rhee, S. K. (2010) Cultivation of autotrophic ammonia-oxidizing archaea from marine sediments in co-culture with sulfur-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 76: 7575–7587.
- Prosser, J. I., Nicol, G. W. (2012) Archaeal and bacterial ammoniaoxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. *Trends in Microbiology* Vol. 20, No. 11
- Reigstad, L. J., Richter, A., Daims, H., Urich, T., Schwark, L., Schleper, C. (2008) Nitrification in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka. *FEMS Microbiol Ecol* 64: 167–174.
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* CSHL Press, 2001 - 2344
- Santoro, A. E., Francis, C. A., de Sieyes, N. R., Boehm, A. B. (2008) Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary. *Environ Microbiol*; 10(4):1068-79.
- Santoro, A. E., Buchwald, C., McIlvin, M. R., Casciotti, K. L. (2011) Isotopic Signature of N₂O Produced by Marine Ammonia-Oxidizing Archaea *Science* Vol. 333, Issue 6047, pp. 1282-1285.
- Schleper, C. (2010) Ammonia oxidation: different niches for bacteria and archaea? *ISME Journal*, 4:1092–1094.
- Schmidt, C. S., Hultman, K. A., Robinson, D., Killham, K., Prosser, J. I. (2007) PCR profiling of ammonia-oxidizer communities in acidic soils subjected to nitrogen and sulphur deposition. *FEMS Microbiol Ecol.* 61(2):305-16.
- Shen, J. P., Zhang, L. M., Zhu, Y. G., Zhang, J. B., He, J. Z. (2008) Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing

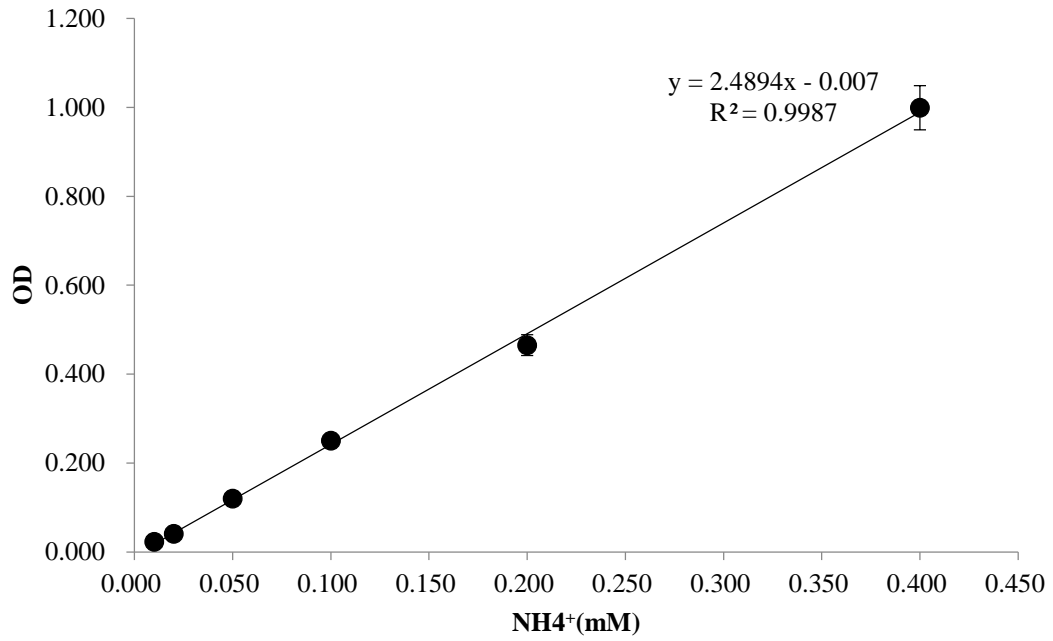
- archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environ Microbiol.* 10(6):1601-11.
- Singh, S. K., Verma, P., Ramaiah, N., Chandrashekar, A. A., Shouche, Y. S. (2010) Phylogenetic diversity of archaeal 16S rRNA and ammonia monooxygenase genes from tropical estuarine sediments on the central west coast of India. *Res Microbiol.* 161(3):177-86.
- Spear, J. R., Barton, H. A., Robertson, C. E., Francis C.A., Pace, N. R. (2007) Microbial Community Biofabrics in a Geothermal Mine Adit. *Appl Environ Microbiol.* 73(19): 6172–6180.
- Stahl, D. A., de la Torre, J. R. (2012) Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. *Annu Rev Microbiol.* 66:83-101.
- Stempfhuber, B., Engel, M., Fischer, D., Neskovic-Prit, G., Wubet, T., Schöning, I., Gubry-Rangin, C., Kublik, S., Schloter-Hai, B., Rattei, T., Welzl, G., Nicol, G. W., Schrumpf, M., Buscot, F., Prosser, J. I., Schloter, M. (2014) pH as a driver for ammonia-oxidizing archaea in forest soils. *Microb Ecol.* 69(4):879-83.
- Teske, A., Elm, E., Regan, J. M., Toze, S., Rittmann, B. E., Stahl, D. A. (1994) Evolutionary relationships among ammonia and nitrite oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology* 176, 6623-6630.
- Tourna, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Könneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T., Engel, M., Schloter, M., Wagner, M., Richter, A., Schleper, C. (2011) *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(20):8420-5.
- Treusch, A. H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S. C., Klenk, H. P., Schleper, C. (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling.

- Environ Microbiol. 7(12):1985-95.
- Tripathi, B. M., Kim, M., Tateno, R., Kim, W., Wang, J., Lai-Hoe, A., Shukor, N. A. A., Rahim, R. A., Go, R., Adams, J. M. (2015) Soil pH and biome are both key determinants of soil archaeal community structure. *Soil Biology and Biochemistry* Vol 88, 1–8.
- Vajjala, N., Martens-Habbena, W., Sayavedra-Soto, L. A., Schauer, A., Bottomley, P. J, Stahl, D. A, Daniel, J. A. (2013) Hydroxylamine as an intermediate in ammonia oxidation by globally abundant marine archaea. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 1006–1011.
- Wang, C., Shan, B., Zhang, H., Zhao, Y. (2014) Limitation of spatial distribution of ammonia-oxidizing microorganisms in the Haihe River, China, by heavy metals. *J Environ Sci (China)*. 1;26(3):502-11.
- Wang, S., Wang, Y., Feng, X., Zhai, L., Zhu, G. (2011) Quantitative analyses of ammonia-oxidizing Archaea and bacteria in the sediments of four nitrogen-rich wetlands in China. *Appl Microbiol Biotechnol*. 90(2):779-87.
- Watson, S. W., Bock, E., Harms, H., Koops, H. P., Hooper, A. B. (1989) Nitrifying bacteria. J.T. Staley, M.T. Bryant, N. Pfennig, J.G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 1808–1834.
- Weidler, G. W., Dornmayr-Pfaffenhuemer, M., Gerbl, F. W., Heinen, W., Stan-Lotter, H. (2007) Communities of Archaea and Bacteria in a subsurface radioactive thermal spring in the Austrian Central Alps, and evidence of ammonia-oxidizing Crenarchaeota. *Appl Environ Microb* 73: 259–270.
- Winogradsky, S. (1892) Contributions a` la morphologie des organismes de la nitrification. *Arch Sci Biol* 1: 88–37.
- Yao, H., Gao, Y., Nicol, G. W., Campbell, C. D., Prosser, J. I., Zhang, L., Han,

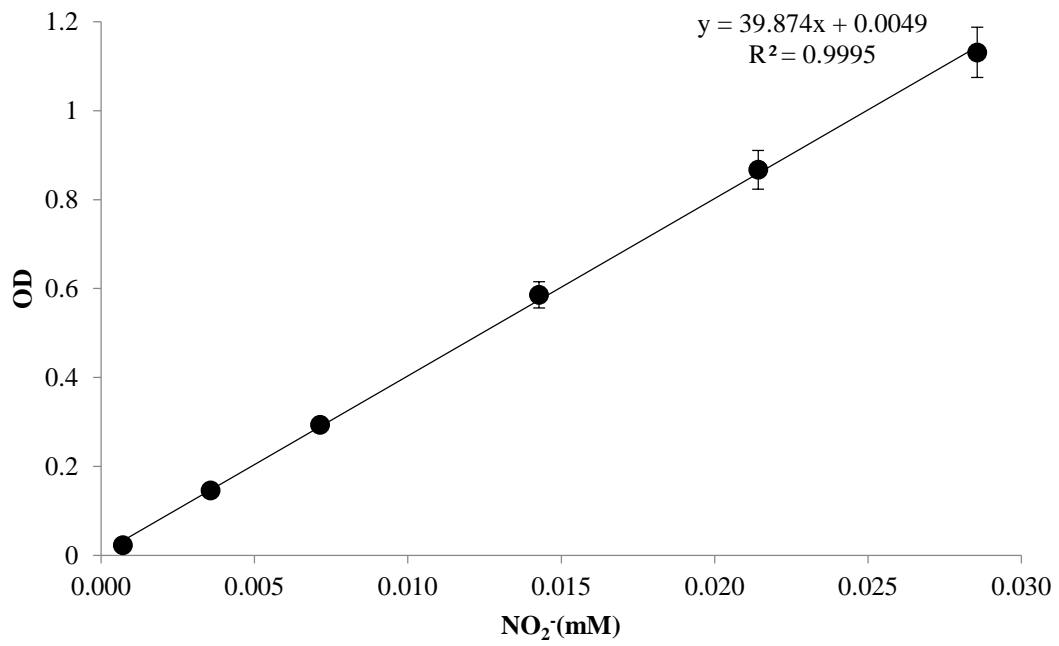
- W., Singh, B. K. (2011) Links between Ammonia Oxidizer Community Structure, Abundance, and Nitrification Potential in Acidic Soils. *Appl Environ Microbiol.* 77(13): 4618–4625.
- Zhalnina, K., de Quadros, P. D., FAO Camargo, Triplett, E. W. (2012) Drivers of archaeal ammonia-oxidising communities in soil. *Front Microbiol* 3: 210.
- Zhang, C. L., Ye, Q., Huang, Z., Li, W., Chen, J., Song, Z., Zhao, W., Bagwell, C., Inskeep, W. P., Ross, C., Gao, L., Wiegel, J., Romanek, C. S., Shock, E. L., Hedlund, B. P. (2008) Global occurrence of archaeal *amoA* genes in terrestrial hot springs. *Appl Environ Microbiol.* 74(20):6417-26.
- Zhang, Y., Chen, L., Dai, T., Tian, J., Wen, D. (2015) The influence of salinity on the abundance, transcriptional activity, and diversity of AOA and AOB in an estuarine sediment: a microcosm study. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99(22):9825-33.
- 行政院城鄉發展分署。(2015)彰化海岸生態環境調查計畫

附錄

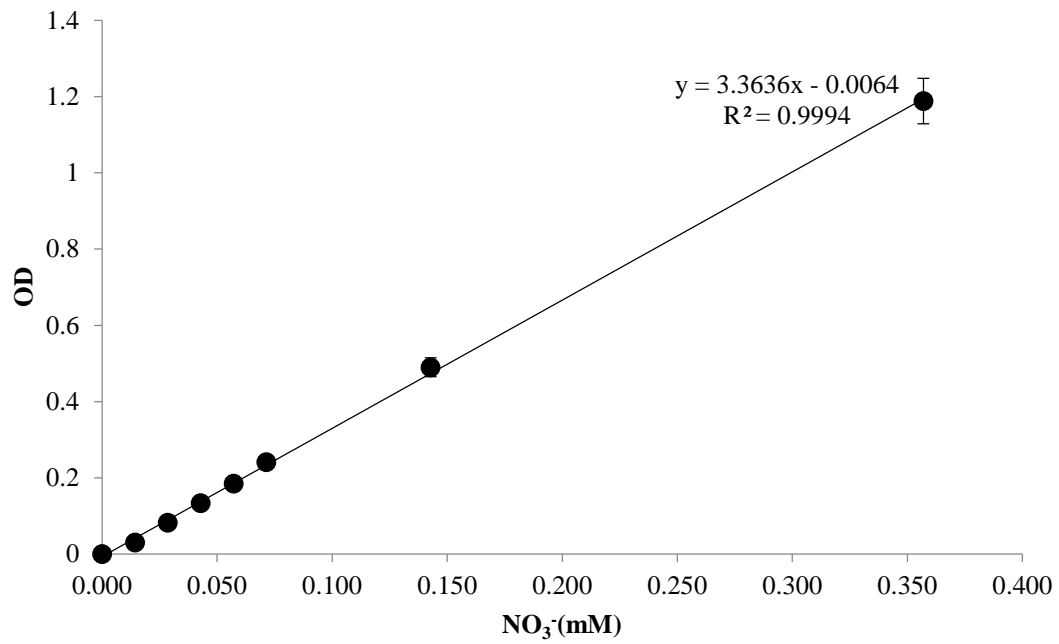
附錄一 氨氮檢量線



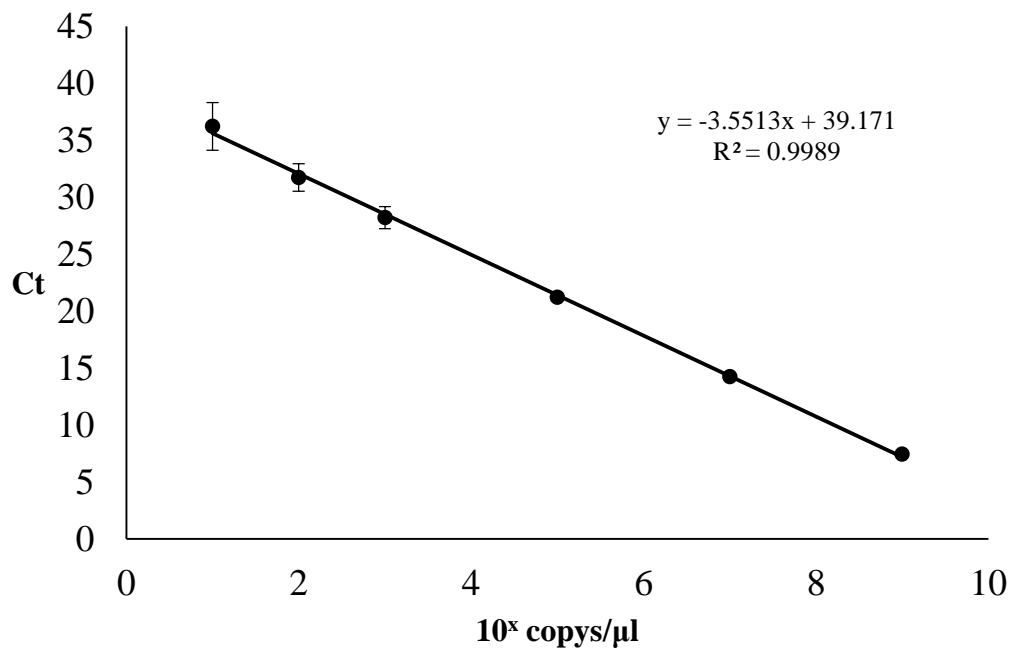
附錄二 亞硝酸檢量線



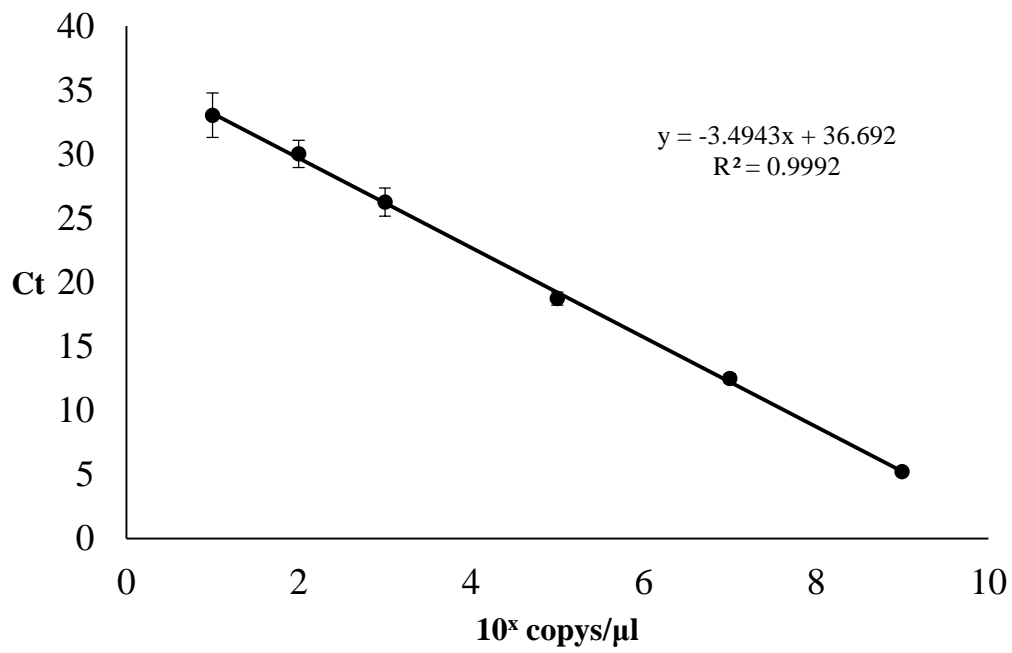
附錄三 硝酸檢量線



附錄四 氨氧化古菌 amoA 基因 qPCR standard curve



附錄五 氨氧化細菌 amoA 基因 qPCR standard curve



附錄六 qPCR melting curve (古菌 amoA 樣本測定)

