

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## 森林土壤有機物分解、微生物生態、養分流動和土壤微生物 基因體之研究(2/3)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC92-2621-B-002-003-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學生化科技學系

計畫主持人：楊盛行

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 5 月 26 日

全球變全球變遷 - 塔塔加高山生態系長期生態研究 -  
森林土壤有機物分解、微生物生態、養分流動和  
土壤微生物基因體之研究 (2/3)

NSC92-2621-B002-007

楊盛行

國立台灣大學生化科技學系及微生物與生化學研究所  
國立屏東科技大學生物科技研究所

摘 要

本研究為探討不同海拔森林土壤微生物生態及微生物於森林土壤有機物分解和養分流動所擔任的角色，選定高海拔塔塔加森林區和低海拔福山森林區，測定溫度及日照等環境條件，水分含量、pH值、總有機碳、總氮、C/N比和灰分等土壤性質，總菌、放線菌、真菌、纖維素分解菌、溶磷菌和固氮菌含量、微生物生質碳、微生物生質氮含量、萃取純化土壤DNA，比較其含量和微生物含量間之關係，同時以DGGE比較不同季節、林相和海拔對微生物生態之影響。結果發現塔塔加雲杉區水分含量50.38-63.30 %、pH值4.41-4.49、總有機碳含量 12.11-27.17 %，總氮含量0.59-1.32 %、碳氮比19.65-21.33 和灰分為36.15-75.87 %；鐵杉區土壤水分含量33.74-70.99 %、pH值3.83-4.09、總有機碳含量 12.86-35.93 %、總氮含量0.21-1.34 %、碳氮比12.98-46.93和灰分為11.52-90.26 %。草原區土壤水分含量36.21-46.17 %、pH值4.18-4.48、總有機碳含量7.05-15.31 %、總氮含量0.24-0.53 %、C/N比29.19-38.98和灰分為76.65-90.79 %。微生物生態方面，雲杉區每克乾重土壤含總菌數 $2.69 \times 10^6$ - $2.39 \times 10^7$  CFU、放線菌  $2.00 \times 10^3$ - $1.70 \times 10^4$  CFU、真菌  $1.30 \times 10^5$ - $5.81 \times 10^5$  CFU、纖維素分解菌  $3.04 \times 10^4$ -  $1.86 \times 10^5$  CFU、溶磷菌  $9.64 \times 10^4$ - $4.46 \times 10^5$  CFU、固氮菌  $1.65 \times 10^4$ - $8.12 \times 10^4$  CFU、微生物生質碳 783.52-1182.73  $\mu\text{g-C}$ 、微生物生質氮 93.42-166.36  $\mu\text{g-N}$ 和核酸含量11.12-44.65  $\mu\text{g}$ 。鐵杉林每克乾重土壤含總菌數  $3.35 \times 10^5$ - $1.74 \times 10^6$  CFU、放線菌  $5.35 \times 10^2$ - $3.36 \times 10^4$  CFU、真菌 $1.68 \times 10^3$ - $1.19 \times 10^4$  CFU、纖維素分解菌 $1.25 \times 10^4$ - $2.57 \times 10^5$  CFU、溶磷菌 $8.83 \times 10^4$ - $3.33 \times 10^5$  CFU、固氮菌 $1.34 \times 10^4$ - $6.78 \times 10^4$  CFU、微生物生質碳557.27-933.54  $\mu\text{g-C}$ 、微生物生質氮 71.23-145.85  $\mu\text{g-N}$ 和核酸含量 11.29-45.98  $\mu\text{g}$ 。草原區每克乾重土壤含總菌數  $1.61 \times 10^5$ - $2.21 \times 10^6$  CFU、放線菌  $1.59 \times 10^3$ - $5.79 \times 10^3$  CFU、真菌  $2.31 \times 10^4$ - $1.14 \times 10^5$  CFU、纖維素分解菌  $8.17 \times 10^3$ - $4.49 \times 10^4$  CFU、溶磷菌 $1.37 \times 10^5$ - $3.34 \times 10^5$  CFU、固氮菌 $1.08 \times 10^4$ - $7.13 \times 10^4$  CFU、微生物生質碳425.93-886.35  $\mu\text{g-C}$ 、微生物生質氮 63.82-133.28  $\mu\text{g-N}$ 和核酸含量8.32-38.49  $\mu\text{g}$ 。

福山溪谷區土壤水分含量18.79-21.09 %、pH值5.23-5.43、總有機碳含量2.09-3.33 %、總氮含量0.21-0.27 %和碳氮比10.88-19.01。中坡區土壤水分含量33.05-52.30 %、pH值4.24-4.43、總有機碳含量5.08-11.43 %、總氮含量0.28-0.47 %和碳氮比11.25-22.58。稜線區土壤水分含量44.71-49.58 %、pH值4.06-4.34、總有機碳含量10.13-11.13 %、總氮含量0.30-0.45 % 和碳氮比23.99-26.29。微生物生態方面，每克乾重溪谷土壤含總菌數  $1.59 \times 10^7$ - $1.68 \times 10^7$  CFU、放線菌  $2.10 \times 10^3$ - $1.40 \times 10^4$  CFU、真菌  $1.42 \times 10^5$ - $2.17 \times 10^5$  CFU、纖維素分解菌  $1.82 \times 10^6$ - $3.47 \times 10^6$  CFU、溶磷菌  $3.20 \times 10^4$ - $1.04 \times 10^5$  CFU、固氮菌  $1.73 \times 10^5$ - $1.95 \times 10^5$  CFU、微生物生質碳196.84-375.28  $\mu\text{g-C}$ 、微生物生質氮 113.42-189.04  $\mu\text{g-N}$ 和核酸含量2.87-26.81  $\mu\text{g}$ 。中坡區每克乾重土壤含總菌數  $3.23 \times 10^6$ - $7.32 \times 10^7$  CFU、放線菌  $2.27 \times 10^3$ - $9.75 \times 10^3$  CFU、真菌  $5.64 \times 10^4$ - $4.53 \times 10^5$  CFU、纖維素分解菌  $2.88 \times 10^5$ - $1.07 \times 10^6$  CFU、溶磷菌  $4.07 \times 10^4$ - $1.86 \times 10^5$  CFU、固氮菌  $2.03 \times 10^5$ - $6.22 \times 10^5$  CFU、微生物生質碳117.93-427.58  $\mu\text{g-C}$ 、微生物生質氮 45.38-228.96  $\mu\text{g-N}$ 和核酸含量3.21-31.46  $\mu\text{g}$ 。稜線區每克乾重土壤含總菌數  $3.15 \times 10^6$ - $6.82 \times 10^7$  CFU、放線菌  $6.68 \times 10^2$ - $3.63 \times 10^3$  CFU、真菌  $4.00 \times 10^4$ - $2.13 \times 10^5$  CFU、纖維素分解菌  $1.68 \times 10^6$ - $2.43 \times 10^6$  CFU、溶磷菌  $7.00 \times 10^4$ - $1.97 \times 10^5$  CFU、固氮菌  $5.45 \times 10^5$ - $1.29 \times 10^6$  CFU、微生物生質碳243.14-526.37  $\mu\text{g-C}$ 、微生物生質氮 60.84-264.80  $\mu\text{g-N}$ 和核酸含量3.45-38.49  $\mu\text{g}$ 。塔塔加草原和福山稜線土壤剖面之 pH值皆上層最低，總有機碳和總氮含量皆最上層O層最高，C/N 則Oa層最低，O層最高。至於微生物含量，其數目皆隨深度之增加而減少。塔塔加草原土壤剖面總菌數減少88.23-91.65 %、放線菌72.67-92.38 %、真菌69.36-96.56 %、纖維素分解菌 56.21-89.41 %、溶磷菌75.63-83.84 % 和固氮菌59.17-89.93 %。土壤DNA萃取與純化方面選用改良式Krsek's方法用來萃取森林土壤DNA；其中Lysis時間延長，添加  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$  50 mM、PVPP 1g/ml 前處理，且利用2 % PVP切膠進行後處理處理。從福山森林土壤DGGE 圖譜研究發現三區微生物族群分佈類似，但數量以有機層較大，下層較低，溪谷在多樣性或數量皆表現較低。

**關鍵詞：**森林土壤、微生物生態、土壤剖面、微生物生質、DNA含量、土壤DGGE圖譜

## Abstract

To investigate the effect of attitude on microbial ecology of forest soils and the role of microbes on the organic matter decomposition and nutritional flow, Tatachia and Fu-Shan forests were chosen. Environment conditions of atmospheric and soil temperatures, light intensity, soil properties of moisture content, pH, total organic carbon, total nitrogen and C/N ratio and populations of total count, actinomycetes, fungi, cellulolytic microbes, phosphate-solubilizing microbes and nitrogen-fixing microbes were measured during the past year. In addition, microbial biomass carbon, microbial biomass nitrogen and DNA content were also studied. In the case of

Tatachia forest, Spruce soil had moisture content 50.38-63.30 %, pH 4.41-4.49, total organic carbon 12.11-27.17 %, total nitrogen 0.59-1.32 %, C/N ratio 19.65-21.33 and ash content 36.15-75.87 %; Hemlock soil had moisture content 33.74-70.99 %, pH 3.83-4.09, total organic carbon 12.86-35.93 %, total nitrogen 0.21-1.34 %, C/N ratio 12.98-46.93 and ash content 11.52-90.26 %; grassland soil had moisture content 36.21-46.17 %, pH 4.18-4.48, total organic carbon 7.05-15.31 %, total nitrogen 0.24-0.53 %, C/N ratio 29.19-38.98 and ash content 76.65-90.79 %. In microbial ecology, each gram of dry Spruce soil contained total microbes  $2.69 \times 10^6$ - $2.39 \times 10^7$  CFU, actinomycetes  $2.00 \times 10^3$ - $1.70 \times 10^4$  CFU, fungi  $1.30 \times 10^5$ - $5.81 \times 10^5$  CFU, cellulolytic microbes  $3.04 \times 10^4$ - $1.86 \times 10^5$  CFU, phosphate-solubilizing microbes  $9.64 \times 10^4$ - $4.46 \times 10^5$  CFU, nitrogen-fixing microbes  $1.65 \times 10^4$ - $8.12 \times 10^4$  CFU, microbial biomass carbon 783.52-1,182.73  $\mu\text{g-C}$ , microbial biomass nitrogen 93.42-166.36  $\mu\text{g-N}$  and DNA 11.12-44.65  $\mu\text{g}$ . Each gram of dry Hemlock soil had total microbes  $3.35 \times 10^5$ - $1.74 \times 10^6$  CFU, actinomycetes  $5.35 \times 10^2$ - $2.36 \times 10^4$  CFU, fungi  $1.68 \times 10^3$ - $1.19 \times 10^4$  CFU, cellulolytic microbes  $1.25 \times 10^4$ - $2.57 \times 10^5$  CFU, phosphate-solubilizing microbes  $8.83 \times 10^4$ - $3.33 \times 10^5$  CFU, nitrogen-fixing microbes  $1.34 \times 10^4$ - $6.78 \times 10^4$  CFU, microbial biomass carbon 557.27-933.54  $\mu\text{g-C}$ , microbial biomass nitrogen 71.23-145.85  $\mu\text{g-N}$  and DNA 11.29-45.98  $\mu\text{g}$ . Each gram of dry grassland soil comprised total microbes  $1.61 \times 10^5$ - $2.21 \times 10^6$  CFU, actinomycetes  $1.59 \times 10^3$ - $5.79 \times 10^3$  CFU, fungi  $2.31 \times 10^4$ - $1.14 \times 10^5$  CFU, cellulolytic microbes  $8.17 \times 10^3$ - $4.49 \times 10^4$  CFU, phosphate-solubilizing microbes  $1.37 \times 10^5$ - $3.34 \times 10^5$  CFU, nitrogen-fixing microbes  $1.08 \times 10^4$ - $7.13 \times 10^4$  CFU, microbial biomass carbon 425.93-886.35  $\mu\text{g-C}$ , microbial biomass nitrogen 63.82-133.28  $\mu\text{g-N}$  and DNA 8.32-38.49  $\mu\text{g}$ .

In the case of Fu-Shan forest, valley soil had moisture content 18.79-21.09 %, pH 5.23-5.43, total organic carbon 2.09-3.33 %, total nitrogen 0.21-0.27 % and C/N ratio 10.88-19.01; middle slope soil had moisture content 33.05-52.30 %, pH 4.24-4.43, total organic carbon 5.08-11.43 %, total nitrogen 0.28-0.47 % and C/N ratio 11.25-22.58, ridge soil had moisture content 44.71-49.58 %, pH 4.06-4.34, total organic carbon 10.13-11.13 %, total nitrogen 0.30-0.45 % and C/N ratio 23.99-26.29. In the microbial populations, each gram of valley soil contained total microbes  $1.59 \times 10^7$ - $1.68 \times 10^7$  CFU, actinomycetes  $2.10 \times 10^3$ - $1.40 \times 10^4$  CFU, fungi  $1.42 \times 10^5$ - $2.17 \times 10^5$  CFU, cellulolytic microbes  $1.82 \times 10^6$ - $3.47 \times 10^6$  CFU, phosphate-solubilizing microbes  $3.20 \times 10^4$ - $1.04 \times 10^5$  CFU, nitrogen-fixing microbes  $1.73 \times 10^5$ - $1.95 \times 10^5$  CFU, microbial biomass carbon 196.84-375.28  $\mu\text{g-C}$ , microbial biomass nitrogen 113.42-189.04  $\mu\text{g-N}$  and DNA 2.87-26.81  $\mu\text{g}$ . Each gram of middle slope soil had total microbes  $3.23 \times 10^6$ - $7.32 \times 10^7$  CFU, actinomycetes  $2.27 \times 10^3$ - $9.75 \times 10^3$  CFU, fungi  $5.64 \times 10^4$ - $4.53 \times 10^5$  CFU, cellulolytic microbes  $2.88 \times 10^5$ - $1.07 \times 10^6$  CFU, phosphate-solubilizing microbes  $4.07 \times 10^4$ - $1.86 \times 10^5$  CFU, nitrogen-fixing microbes  $2.03 \times 10^5$ - $6.22 \times 10^5$  CFU, microbial biomass carbon 117.93-427.58  $\mu\text{g-C}$ , microbial biomass

nitrogen 45.38-228.96  $\mu\text{g-N}$  and DNA 3.21-31.46  $\mu\text{g}$ . Each gram of ridge soil comprised total microbes  $3.15 \times 10^6$ - $6.82 \times 10^7$  CFU, actinomycetes  $6.68 \times 10^2$ - $3.63 \times 10^3$  CFU, fungi  $4.00 \times 10^4$ - $2.13 \times 10^5$  CFU, cellulolytic microbes  $1.68 \times 10^6$ - $2.43 \times 10^6$  CFU, phosphate-solubilizing microbes  $7.00 \times 10^4$ - $1.97 \times 10^5$  CFU, nitrogen-fixing microbes  $5.45 \times 10^5$ - $1.29 \times 10^6$  CFU, microbial biomass carbon 243.14-526.37  $\mu\text{g-C}$ , microbial biomass nitrogen 60.84-264.80  $\mu\text{g-N}$  and DNA 3.45-38.49  $\mu\text{g}$ .

In the soil profiles of Tatachia grassland and Fu-Shan ridge soil, the pH was low at the topsoil, while total organic carbon and total nitrogen were reversed and had high values at the topsoil. In the case of microbial populations, the number decreased with the increasing of soil depth. The populations at the bottom horizon decreased 88.23-91.65 %, 72.67-92.38 %, 69.36-96.56 %, 56.21-89.41 %, 75.63-83.84 % and 59.17-89.93 % as the top horizon in total microbes, actinomycetes, fungi, cellulolytic microbes, phosphate-solubilizing microbes, and nitrogen-fixing microbes, respectively. In the forest soil DNA extraction and purification, the modified Krsek's methods by extending Lysis time, adding  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ , PVPP as pre-washed treatment and PVP gel excising was used. In the DGGE profile of Fu-Shan forest soil, the three sampling sites had similar soil microbial populations. The organic layer had the highest microbial populations, topsoil was the next, and subsoil had the less. The valley soil had the less microbial diversity and the microbial populations was the lowest.

**Keywords:** Forest soil, microbial ecology, soil profile, microbial biomass, DNA content, soil DGGE profile.

## 前 言

生物多樣性是一個地區內生物基因、物種和生態系多樣性的總和。生物多樣性係指地球上各種動物、植物、微生物和它們的遺傳基因，及這些生物和環境所構成的各種生態系，其範圍涵蓋遺傳多樣性、物種多樣性和生態多樣性三個層次(林，2000)。聯合國環境與發展大會於 1992 年地球高峰會議中，由全世界一百餘國領袖簽訂了『生物多樣性公約』後，生物多樣性保育已經受到各國的高度重視。生物多樣性公約的宗旨是『保育生物多樣性，永續使用其組成部份，並公平、合理分享利用遺傳資源所產生的惠益』。目前締約國已達 177 個國家，成為全球最龐大的保育公約。

台灣具有豐富多樣的野生動、植物和微生物，也是一個遺傳多樣性的寶庫。但相關野生微生物遺傳多樣性的研究卻不多也常被忽略，在地球的生態上扮演著非常重要角色，包括自然界元素循環、物質分解和各種資源合成。日常生活中所應用的微生物領域，有醫學微生

物、食品微生物和環境微生物等。生物多樣性學門的研究工作更以遺傳多樣性、物種多樣性和生態多樣性為首要目標。

微生物是自然界中多樣性最豐富的生態系，然而土壤微生物多樣性直到最近幾年才受到重視。土壤微生物卻在土壤生態系中扮演著關鍵性的重要角色(Hilger等, 2000)，近年來，土壤生態學界亦提出「微生物多樣性」(microbial diversity)的觀念，強調微生物之物種與基因多樣化的重要性。期望能找出有益新藥物、抗生素和工業產品，生物多樣化在生態系中具有物種豐富功能群，可用生化、免疫和分子生物各學門的酵素或抗體。微生物多樣性是維持地球生態平衡最主要貢獻者，在自然界中扮演分解者，亦提供人類文明所需之原料、溶劑、酵素、抗生素、生物農藥、醫藥品、發酵產品、採礦、元素循環、污染物去除等。

土壤係植物生長之自然媒介，此種疏鬆表層針對森林植被的長期作用下便形成森林土壤。因此森林土壤本身具有和森林植物生物學特性一致的許多性狀，溫帶闊葉及落葉林的土壤枯枝落葉層、半分解層和腐植質層明顯且數量多，土壤近乎中性，黏化作用占主導地位；熱帶南亞熱帶常綠闊葉林下，由於高溫多雨、有機質分解迅速、微生物活性旺盛及淋溶作用強烈使土壤剖面具有另一種性質，有機質層不多、鹽基飽和度低、土體酸性強及粘粒下移明顯等(張, 1992)。Haynes(1986)指出，分解作用在中性土壤比酸性土壤快，若土壤 pH 改變，則土壤中微生物族群及活性將亦隨之改變。土壤中小分子之有機物(如酚類、胺基類、醣類等)會被微生物作用成大分子的有機物，諸如腐植質等。Ronse(1988)等發現比利時森林土壤普遍存在著土壤表層酸化情形，其即為有機酸之影響，土壤 pH值隨著深度增加逐漸升高。森林土壤與森林植被互相影響、互相促進和互相依存，一旦森林遭受破壞，森林土壤性質也隨之發生變化，直至遭受地表逕流的侵蝕土體消失，森林土壤侵蝕流失則森林難以恢復(2001, 劉)。長久以來研究土壤微生物的結果發現可以由培養基分離出來的微生物不到所有微生物的 20 % (Lee和Pankhurst, 1992)，甚至有學者認為只有 0.001-0.3 % (Amann等, 1995)。微生物可能存在的種類推估差距極大，且可能永遠無法估算。幾乎所有的方法都低估了土壤微生物之個體數目與種的數目(Lee, 1994)。

隨著各種諸如純化與選殖基因等分生技術的進步，從土壤微生物中尋找各種新物質成了橫跨生物與化學界中一項新領域的科學，從土壤中可以分離並純化出原本不能在培養基中生長的微生物，將帶功能性基因釣出並選殖入可以培養的載體中大量生產出各種新化合物，所有的土壤微生物的基因可以整合視為一個大的土壤微生物族群基因庫- the metagenome，土壤微生物多源基因體之功能性研究(Handelsman等, 1998)。利用 BCA 載體，我們可以從微生物棲地的基因庫中純化出大的 DNA 片段 (>50 kb)，然後轉殖入 *E. coli* 等載體中，再刺激誘導載體中帶有的功能性基因產生各種蛋白質、酵素、賀爾蒙。

土壤有機質約有 1-3 % 來自於土壤微生物生質量，土壤微生物生質量為土壤中具生命力之有機體。在大多數的土壤系統中，生質量除了是植物養分的供應者，亦可作為系統內其他生物的食物碎屑。不僅是無機養分的源與匯之供應者

(Juma和Paul, 1981)。為說明土壤生態系，養分及能量進出流向互動及控制機制，適合的生質量定量方法是重要且必須的。

近年來，在分離 DNA 的步驟以及隨後的分析程序都有改良方法，使得比原來方法更加簡單以及方便。分離土壤細菌 DNA 起源於 Torsvik(1980)，利用不同離心速度將微生物分開，再進行溶解微生物細胞，層析所分離出來的 DNA 或 RNA。後來許多改良方法都是朝著提高回收率和純度以及朝著使用更小量樣品的方向邁進(Tsai 和 Olson, 1991; Kuske 等, 1998)。少量樣品(從 250 mg 到 1 g)可置於微量離心管中操作，且回收率仍可達 80%以上(Zhou 等, 1996; Kuske 等, 1998)。

本研究中福山代表台灣低海拔主要的暖溫帶闊葉林生態系，塔塔加則代表台灣的高山生態系諸如針葉林相及草原相。以此兩種不同的典型森林地探討於秋季時微生物生態的多樣性變化和土壤性質。

## 材料與方法

### 1. 研究區域概述

#### (1).塔塔加試驗地概述

福山代表台灣低海拔主要的暖溫帶闊葉林生態系，塔塔加則代表台灣的高山生態系諸如針葉林相及草原相。以此兩種不同典型森林地探討微生物生態多樣性。塔塔加地區位在台灣中部山區，玉山國家公園西北部的入口，位於楠梓仙溪、沙里仙溪及神木溪的上游地區，為台灣大學實驗林地之一部份，海拔高度介於 1,800-2,500 公尺間。塔塔加山區之植被因分布之海拔高度、地形、氣候等因素差異，大致可分為雲杉林 (*Picea morrisonicola*)、鐵杉林 (*Tsuga chinensis*) 以及草原地區 (由於平均植群在 1m 以下，可視為林分外之微環境)，塔塔加為台灣長期生態研究之試驗區之一。土壤樣體分別取自上述三個不同植被區域之上層土壤 (0-20cm)、下層土壤 (21-40cm) 和有機層，另外在草原區與草原過渡帶採集土壤剖面之土壤樣品 (依土壤性質分為 O 層、Oa 層、A 層及 Bw1 和 Bw2 層共五層)。其中 O 層代表陸地表面主要由有機物堆積的層次；Oa 層代表腐爛或高度分解有機物；A 層代表形成在地表或 O 層之下的礦物質化育層；Bw1 與 Bw2 層為形成在 O 層或 A 層下之化育層，該層已有不同顏色或構造發育，但甚少或無明顯洗入物質累積。

#### (2).福山試驗地概述

福山試驗林位於台北縣烏來鄉及宜蘭縣員山鄉交界處，海拔高度為 500-1,400 m，平均高約 850 m。約北緯 24°34'，東經 121°34'。試驗林之樹種組成以樟科、殼斗科和茶科植物佔優勢，與台灣中低海拔闊葉林相類似。本研究樣區位於哈盆溪上游之稜線側方西南向坡面，平均坡度約為 10°，在每一截線分溪谷，中坡及稜線等不同生育地設置樣區，分四季採取土樣。樣區分類方式如下：  
A. 稜線(ridge)：山坡的頂端，地勢平緩，土壤發育良好，雨水沖蝕現象輕微，土

壤層較深，大多為黃壤 ( yellow soils ) ，深厚的土壤與平緩的地形有助於植物根系發展。

- B. 中坡 ( middle slope ) : 中坡地區的平均坡度高達 33.7 度，地勢陡峭，容易發生土壤沖蝕現象，所以土壤發育不完全，多為崩積土 ( colluvial soils ) ，土層淺薄，灌層根系無法充分發育伸展。
- C. 溪谷 ( valley ) : 溪谷生育地的平均坡度為 27.2 度。大多為石質土 ( lithosols ) ，受到溪谷水流沖刷以及陡峭山壁崩削雙重影響，干擾最為嚴重，植株密度為三種生育地中最低。

## 2. 土壤性質分析

### (1). pH 值

20 g 土壤樣品於 50 mL 的燒杯內，加入 20 mL 去離子水 1 比 1 ( w/v ) 比例混和，並在 30 分鐘內攪拌懸浮液數次。靜置懸浮液約 1 小時，使懸浮的泥土沈澱，以 pH 計測定其值。

### (2). 土壤水份含量

以篩網去除大於 2 mm 直徑的石礫、樹枝等。取適量土壤在 105 下烘乾至恆重後，測定土壤重量的變化，換算為每克土壤之水分含量。

### (3). 土壤總有機碳含量

土壤中的有機碳含量以 Walkey-Black 法測定 ( Rhoades , 1982 ) 。

### (4). 土壤總氮含量

土壤中的總氮含量採改良之 Kjeldahl 法 ( Bremner 和 Mulvaney , 1982 ) 測定。

### (5). 土壤灰分測定

稱取適量之樣品至 0.001 g ( 約 1.0-5.0 mg ) ，置於已稱重量之坩堝中，先以 105±5 之溫度預熱 30 分鐘，再將溫度調至 850±5 維持三小時。使可燃分充分氧化，所剩殘渣佔原土樣之重量百分率即為該試樣之乾基灰分。

## 3. 微生物菌數測定

採用平板計數法 ( plate count ) 。土壤以無菌水作一系列稀釋後，取 1ml 之懸浮液置於培養皿中，再倒入適當之培養基。在 25 常溫下培養，觀察並計算菌數。

### (1). 總菌數之測定

土壤以無菌水作一系列稀釋後，取 1ml 之懸浮液置於培養皿中，而使用之培養基為營養洋菜培養基。在 25 下培養一週後，觀察並計



算其總菌(楊, 1997)。主要培養的對象以其營養需求不很嚴格的微生物為主。

#### (2).放線菌數測定

土壤以無菌水作一系列稀釋後, 取 1ml 懸浮液置於培養皿中, 使用甘油酵母抽出培養基, 在 25 °C 下培養一週, 觀察並計算其放線菌之數目(楊, 1997)。

#### (3).真菌菌數測定

土壤以無菌水作一系列稀釋後, 取 1ml 之懸浮液置於培養皿中, 使用 Rose bengal 培養基, 於 25 °C 下培養 3-5 天後, 觀察並計算其真菌之數目(楊, 1997)。

#### (4).纖維素分解活性微生物測定

以含 CMC 為唯一碳源之培養基, 於 25 °C 下培養 3-7 天, 觀察其在培養基上生長, 且以 Congo red 噴灑, 如產生透明環, 即為具纖維素分解活性之菌株(楊, 1997)。

#### (5).溶磷菌數測定

以磷礦粉為磷源, 在 25 °C 下培養 3-5 天, 測其透明圈, 探討不同林相或季節性溶磷菌之變化情形(楊, 1997)。

#### (6).固氮菌數測定

因而以未含氮源之 NFB 培養基 (Krieg 和 Dobereiner, 1984) 在 25 °C 下培養 3-7 天, 測定固氮族群, 探討不同林相季節中, 固氮菌族群之變化(楊, 1997)。

### 4.微生物生質量的測定

#### (1).微生物生質碳量的測定

微生物的生質碳 (microbial biomass carbon) 採薰蒸萃取法 (fumigation-extraction method) 定量 (Vance 等, 1987a、1987b、1987c)。

#### (2).微生物生質氮量的測定

微生物生質氮量 (microbial biomass nitrogen) 的測定採用薰蒸萃取法 (fumigation extraction method) (Raghubanshi, 1991)。

### 5.微生物核酸量測定

微生物核酸量採用 ex situ 方法先將樣品中的菌體分解, 再進行核酸的分離與純化 (Trevors 等, 1995; Krsek 和 Wellington, 1999) 粗萃取的 DNA 藉由分光光度計的  $A_{260}/A_{280}$  和  $A_{260}/A_{230}$  的比率來決定不純物蛋白質和腐植酸的量, 亦可知 DNA 的純度。藉由  $A_{260}$  的數值得知, 當  $A_{260}=1.0$  時, DNA 的濃度為 50  $\mu\text{g/mL}$  (Holben, 1994)。

### 6.萃取 DNA

根據本實驗室過去採用的五種直接溶解細胞的方法來萃取塔塔加地區的土壤微生物DNA，五種比較方法如下：

(1).方法A

依 Zhou等(1996)方法，取出5 g 採集的土樣，加入13.5 mL DNA 萃取緩衝液(100mM pH 8.0 Tris-HCl, 100mM pH 8.0 sodium EDTA, 100mM pH 8.0 sodium phosphate, 1.5M NaCl, 1% CTAB), 以及100  $\mu$  L 的proteinase K( 10mg/mL), 一起置入錐形瓶中, 在37 以225 rpm 的速度搖晃30分鐘, 加入1.5 mL 20 % sodium dodecyl sulphate( SDS ), 在65 水浴培養2小時, 每隔15-20分鐘上下搖晃一次。室溫下6000 $\times$ g 離心10分鐘後收集懸浮液, 沈澱物加入4.5 mL 緩衝液和0.5 mL 20 % SDS後, 懸晃10秒鐘再置入65 水浴培養10分鐘, 離心收集懸浮液。經過三次的重複萃取後的懸浮液加入等體積的chloroform/isoamyl alcohol(24:1, v/v)。水溶液部份經回收後, 與0.6倍體積isopropanol反應一小時, 以16000 $\times$ g離心20分鐘得粗萃核酸。使用70 %冰酒精清洗後再將之懸浮於在500  $\mu$  L 無菌去離子水中, 利用gel plus centrifugal concentrator純化DNA。

(2).方法B

依 Liu等(1997)方法取5 g土樣, 懸浮於9 mL溶解液內(100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 0.75 M sucrose), 加入Lysozyme ( 1mg/mL) 後37 培養30分鐘, 加入proteinase K(200  $\mu$  g/L)和SDS(1 %, wt/vol), 37 下培養2小時, 每30分鐘搖晃一次。三次的freeze-thaw循環後, 室溫下以4100 $\times$ g離心10分鐘後取上清液。加入CTAB到最終濃度1 % ( wt/vol ) 和0.7M NaCl, 在65 下培養20分鐘。利用等體積的phenol-chloroform-isoamyl alcohol(25:24:1) 萃取, 利用等體積的chloroform/isoamyl alcohol(24:1, v/v)再萃取。加入等體積的冰isopropanol 後, 以10分鐘10000 $\times$ g 離心取得沈澱物, 沈澱物使用70 %冰酒精清洗, 將DNA懸浮於500  $\mu$  L 無菌水中 ( 必要時可利用 low-melting-point agarose gel 再度純化 )。

(3).方法C

依 Trevors和van Elsas ( 1995 ) 方法, 取1 g的土壤樣本於15 mL 離心管中, 加入2.5 mL緩衝液 ( 120 mM pH 8.0 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 % SDS, 100  $\mu$  g/ml proteinase K), 均勻混合後, 37 恆溫培養1小時, 期間不定時搖晃反應物。加入450  $\mu$  L 5M NaCl, 激烈振盪。加入375  $\mu$  L 10 % CTAB ( Hexadecyltrimethylammonium bromide )( 溶於0.7 M NaCl溶液中 ), 65 恆溫培養20分鐘。加入等體積的chloroform溫和振盪。之後進行4 9000 $\times$ g離心15分鐘。將水層部份取出並加入等體積的isopropanol, 混合均勻後置於-20 的恆溫設備培養1小時。在4 10000  $\times$ g離心25分鐘, 乾燥沈澱物, 加入200  $\mu$  L 無菌水溶解沈澱物, 進行

瓊脂凝膠法純化。

#### (4).方法D

依 Krsek和Wellington (1999)方法,取2 g土壤樣本,加入TE buffer ( 10 mM pH 8.0 Tris-HCl , 1 mM pH 8.0 EDTA ) 均勻混合,進行超音波震盪 ( sonication ), 加入5 mg/ml Lysozyme 37 培養1小時。再加入 SDS 到最後濃度為 1 % , 65-70 培養30分鐘,在室溫下4100×g離心10分鐘得上清液,加入1/5V 8M Potassium acetate ( KAc ) 後在冰上培養15分鐘,4 13800×g離心20分鐘。沈澱物以TE buffer回溶,加入1/2V 50 % polyethyleneglycol 6000 ( PEG ) ( wt/wt ) 和1/10V 5M NaCl 進行隔夜(overnight)沈澱作用。其後進行等體積phenol/chloroform純化作用。加入0.3M sodium acetate和9/10V冰isopropanol混合後在-70 下進行沈澱作用10分鐘,再利用16400×g離心10分鐘得沈澱物。加入5 mM spermine-HCl ( 溶於TE buffer ) 後冰上沈澱15分鐘。最後沈澱物溶在500 μ L無菌水中。期間進行沈澱作用所得的沈澱物皆利用TE buffer回溶。

#### (5).方法E

依 Krsek和Wellington(1999)方法,和方法D的步驟相同,不同的是使用 Crombach buffer ( 33mM pH 8 Tri-HCl , 1mM pH 8 EDTA ) 代替TE buffer。

以上五種方法最後以波士特 Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extraction Kit 進一步純化 DNA。

## 7.DNA 純化方法

為了去除森林土壤難以分離的腐植酸、色素、黏土等雜質,在建立良好 DNA 萃取流程,嘗試各種添加處理過程以處理各種不同性質的土壤。

### (1).不同緩衝液

緩衝液 A(100 mM pH 8.0 Tris-HCl , 100 mM pH 8.0 sodium EDTA , 100 mM pH 8.0 sodium phosphate , 1.5M NaCl , 1 % CTAB ); 緩衝液 B ( 100mM Tris-HCl , 100mM EDTA , 0.75M sucrose ); 緩衝液 C ( 10mM pH 8.0 Tris-HCl , 1mM pH 8.0 EDTA ); 緩衝液 D ( 33mM pH 8 Tri-Hcl , 1mM pH 8 EDTA )。

### (2).不同前處理方法

Braid 等(2003)發現利用  $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$  等 chemical flocculation 在 lysis 流程中作前處理可有效的去除影響 PCR 反應的雜質。本研究中使用不同濃度 50 、 100、 200 mM  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$  和 50、 100、 150 mM  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  作比較。由於能吸附苯環化合物, polyvinylpyrrolidone(PVPP)和 polyvinylpyrrolidone ( PVP ) 亦常在各種純化流程中使用 (Berthelet 等, 1996; Holben 等, 1988; Steffan 等, 1988;

Trevors 等, 1992; Young 等, 1993)。本實驗使用 PVPP 0.1g/ml 和 0.2g/ml 作為前處理的比較。

### (3).不同後處理方法

利用 2 % PVP 加入電泳膠中, 在電泳過程, PVP 會吸附 DNA 溶液中的雜質, 使 DNA 與雜質分離, 經由切膠將 DNA 純化 (Loomis, 1974)。Spermine-HCl 進行後處理能吸附蛋白質, 對 DNA 作進一步純化 (Krsek 和 Wellington, 1999)。

## 8. 建立 DGGE 測定系統

變性梯度膠體電泳分析 (DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis), 是以 DNA 的變性原理來偵測 DNA 變異的一種生物技術, 其偵測範圍遠較 RFLP 及 RAPD 大, 理論上可達到一片 DNA 百分之百鹽基變化的解析力, 因此是具有發展潛力的一種生物技術。

DGGE 的解析範圍受 DNA 的序列結構所限制, 當一段 DNA 僅有一個  $D_m$ , DGGE 就無法分析, 這段 DNA 由低變性濃度向高變性濃度移動, 到達  $T_m$  時 DNA 就整段分開, 不會減速, 而無法在電泳膠體中顯現。另一種情況是, 一般 DNA 有兩個  $D_m$ , 則 DGGE 只能分析第一個  $D_m$ , 而不能分析第二個  $D_m$ , 因為第二個  $D_m$  是呈雙股狀態。也就是把這段 DNA 接到一個 GC 很高的小片段 (名之為 GC clamp), 再以 DGGE 分析, 這種處理使原來具有一個  $D_m$  的片段變成兩個  $D_m$ 。也使原來兩個  $D_m$  的片段經調整變性梯度範圍後變成兩個新的  $D_m$ , 因為 GC clamp 的  $T_m$  很高, 所以單獨成為一個  $D_m$ , 而原來的第一個  $D_m$ , 其  $T_m$  較 GC clamp 低; 如此當溫度達到較低的  $T_m$  時除 GC clamp 之外的 DNA 全部解鏈而減速, 換言之 DGGE 的偵測範圍可以擴大到 100 %。

Primer 的選擇主要來自於 16S 或 18S rRNA 基因的片段放大, 用 DGGE 分析這些片段常用以解釋環境樣品中微生物多樣性和偵測微生物物族群隨時間或環境、地域性的改變。不同的 primer 有不同的靈敏度, 因此 primer 的選擇十分重要, 且針對不同的微生物族群諸如細菌、真菌、放線菌等或是功能基因也常被使用來分析鑑定微生物和探討親緣關係, 如: 鉍氧化細菌的鉍單氧氧化基因 (Rotthauwe 等, 1997), 脫硝菌的亞硝酸還原基因 (Hallin 和 Lindgren, 1999), 甲烷氧化菌的甲醇脫氫基因。通常是針對某一類生理功能特性相同之微生物分析, 即具有某一相同的重要功能基因者。親源關係上, 也只侷限於分析具有此基因之微生物間的親源關係; 由於功能基因的專一性較 16S rRNA 基因高, 針對功能基因設計的引子和探針較不易受到非對象細菌的干擾, 且能直接反應出某一類細菌群的親源演化關係, 然而資料庫之序列並不如 16S rDNA 豐富, 在引子和探針設計上會受到一些限制, 由於近幾年功能基因研究增加, 限制情形正逐漸改善中。本實驗

所選取之 primer 如表一所示。利用 PCR 反應器 ( 2400 , Perkin-Elmer cutes , USA ) 先加熱至 95 5 分鐘 , 再進行三十個循環 : 95 1 分鐘 ; 52 1 分鐘 , 72 2 分鐘 , 最後 72 6 分鐘。

表一、本實驗 primer 選擇

Table 1. Primer selection in this study

Primer	16S rDNA target	Sequence (5'-3')
P1 (341FGC)(Muyzer <i>et al.</i> , 1993)	Eubacterial	CCT ACG GGA GGC AGC AG
P2(534R)(Muyzer <i>et al.</i> , 1993)	Universal	ATT ACC GCG GCT GCT GG
P3(907R)(Teske <i>et al.</i> , 1997)	Universal	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT
P4(F984GC)(Heuer <i>et al.</i> , 1997)	Eubacterial	AAC GCG AAG AAC CTT AC
Primer 534R	Universal	ATT ACC GCG GCT GCT GG
Primer 341F	Universal	GCC TAC GGC AGG CAG CAG
A1(F243)(Heuer <i>et al.</i> , 1997)	Actinomycetes	GGA TGA GCC CGC GGC CTA
A2(R513GC)(Heuer <i>et al.</i> , 1997)	Actinomycetes	CGG CCG CGG CTG CTG GCA CGT
FGC	Universal	GAA CGC GAA GAA CCT TAC
NRGC	Universal	ACG GGC GGT GTG TAC

**GC clamp** (Heuer *et al.*, 1997) :

CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG

## 9. DGGE的操作

製備 DGGE 膠體之主要步驟描述如下 , 首先在 14 % 的 polyacryamide gel (25 ml) 中摻進直線梯度由 0-80 % 的連續變性溶液 [ 100 % = 7M urea , 40 % formamide (v/v) ] 。將上述溶液灌進以 teflon spacer (0.75mm) 隔離的兩片玻璃之間 , 膠體最上層 ( 樣品下面 ) , 有 1 cm 的區域是 0 % 變性溶液。膠體放入一個裝有 60 ( 因為在 100 % 的變性藥劑下 , 對 DNA 解鏈的相對效率而言為 35-40 , 所以必須將外界溫度設在 60 , 如此才能使 DNA 在電泳的分析過程中以相對於 60-90 的梯度變性效應 ) 的 running buffer (40 mM pH 7.4 Tris-acetate , 20 Mm sodium acetate , 1 mM EDTA) 的水缸中 , 水缸上面裝有 60 循環液體儀器 ( peristotic pump ) 和加熱器 , 電泳以 150 V 操作數小時後 , 取出膠體 , 用銀染法染色 , 照相。在不同的實驗要求下作適度修飾。所有的實驗皆三重複 , 且至少進行三次。

## 10. 統計分析

以 SAS 8.0 分析軟體進行分析並使用一般線性模式程序 ( general linear models procedure ) 進行鄧肯氏多變域分析法 (Duncan's Multiple Range Test ) 分析不同採樣位置與時間間隔之差異性及相關性分析探

究各環境因子與微生物間的相關性。

採鄧肯氏多變域分析法做組群間之差異性比較，各平均值之上標小寫英文字母若有差異，即表示其平均值有顯著之差異。多重比較法的臨界值設定，均是採用試驗所得的資料，經過某個公式運算後得到一個臨界值。若兩個處理間的差異很大，則潛在錯誤風險亦大，應套用較大的臨界值；反之若差異很小，則應套用較小的臨界值。故鄧肯氏多變域分析法的臨界值並非固定唯一，而是隨差異的大小變化。

## 結果與討論

### 1.環境條件及土壤性質

秋季塔塔加及福山森林環境條件列於表二及表三。

#### (1).pH 值

塔塔加與福山土壤層間的 pH 值均以土壤下層較高，有機層與上層較低；呈現由上層往下層遞增的趨勢(表二及表三)。其中塔塔加鐵杉區的 pH 值較其他二採樣區略低，塔塔加鐵杉區的 pH 值較雲杉區低的現象，應與前者堆積落葉較後者不易分解，有大量腐植酸堆積所致。宋(1999)於塔塔加研究台灣二葉松根圈土壤亦發現其 pH 值平均為 4.30。低於本體土壤的 pH 值 4.82，且有極顯著差異，可見植體的有機酸分泌與落葉腐植酸堆積會影響土壤 pH 值變化。故由在剖面層的 pH 值方面，塔塔加與福山土壤均以最上層有最低 pH 值。

#### (2).水份含量

塔塔加與福山土壤層間的水分含量均以有機層最高，上層次之和下層最低，呈現由上往下遞減趨勢。其中，塔塔加草原區含水量較其他區低，且各層間含水量較為接近。塔塔加草原區含水量較其他二區者低的原因，主要是由於此區無大型立木的茂密枝葉遮蔽，故土壤中的水分相對較易蒸散，有機表層含水量與土壤上層接近。塔塔加與福山土壤剖面層間含水量均以最上層最高，隨深度增加而遞減。

#### (3).總有機碳含量

塔塔加與福山土壤層間的總有機碳含量均以有機層最高，上層次之和下層最低，呈現由上往下遞減趨勢。塔塔加草原區總有機碳含量較其他二區低，此結果與世界上許多地區森林-草原交界處有相同的結果(王，1999)，此與草原土壤落葉量及黏粒較少有關。雲杉區與鐵杉區總有機碳含量高於福山所有樣區。塔塔加雲杉區與鐵杉區土壤有較高的總有機碳含量與雲杉及鐵杉的落葉層堆積有關，因而草原區總有機碳含量較低。塔塔加與福山土壤剖面總有機碳含量均以最上層最高，福山土壤剖面層間的差異較小。

表二、塔塔加高山森林環境條件及土壤性質

Table 2. Environmental conditions and soil properties of Tatachia forest

Properties	Organic layer	Topsoil (0~20 cm)	Subsoil (21~40 cm)
<b>Altitude (m)</b>	2500	2500	2500
<b>Annual precipitation (mm)</b>	3000 (avg.)	3000 (avg.)	3000 (avg.)
<b>Vegetation</b> : Spruce Hemlock Grassland	Spruce, dwarf bamboo, morrisonicola Hemlock, dwarf bamboo, Grass, pine, dwarf bamboo		
<b>Soil Color:</b> Spruce Hemlock Grassland	Blackish brown Blackish brown Blackish brown	Blackish gray Blackish gray Blackish yellow	Yellowish gray Yellowish gray Yellowish gray
<b>Atmospheric temperature (°C)</b> Spruce Hemlock Grassland	10.7 <sup>a</sup> *(Fall)---6.3 <sup>c</sup> (Winter)---9.3 <sup>b</sup> (Spring) 14.2 <sup>a</sup> (Fall)---12.7 <sup>b</sup> (Winter)---7.5 <sup>b</sup> (Spring) 24.5 <sup>a</sup> (Fall)---17.0 <sup>b</sup> (Winter)---21.6 <sup>ab</sup> (Spring)		
<b>Soil temperature (°C)</b> Spruce Hemlock Grassland	11.6 <sup>a</sup> (Fall)---4.7 <sup>b</sup> (Winter)---4.7 <sup>b</sup> (Spring) 15.2 <sup>a</sup> (Fall)---5.2 <sup>b</sup> (Winter)---4.3 <sup>b</sup> (Spring) 18.2 <sup>a</sup> (Fall)---5.8 <sup>b</sup> (Winter)---8.1 <sup>b</sup> (Spring)		
<b>Light intensity</b> Spruce Hemlock Grassland	2970 <sup>a</sup> (Fall)---610 <sup>b</sup> (Winter)---2836 <sup>a</sup> (Spring) 667 <sup>a</sup> (Fall)---917 <sup>a</sup> (Winter)---1129 <sup>a</sup> (Spring) 7200 <sup>b</sup> (Fall)---52300 <sup>a</sup> (Winter)---17268 <sup>b</sup> (Spring)		
<b>pH</b> <b>Spruce</b> Fall Winter Spring <b>Hemlock</b> Fall Winter Spring <b>Grassland</b> Fall Winter Sprin	4.99±0.01 <sup>a,A</sup> 4.52±0.04 <sup>a,A</sup> 4.32±0.02 <sup>b,A</sup> 3.66±0.01 <sup>a,AB</sup> 3.39±0.04 <sup>b,AB</sup> 3.49±0.08 <sup>b,AB</sup> 4.16±0.01 <sup>a,A</sup> 4.39±0.04 <sup>a,A</sup> 4.41±0.08 <sup>a,A</sup>	4.74±0.01 <sup>a,A</sup> 4.20±0.04 <sup>b,A</sup> 3.96±0.06 <sup>c,AB</sup> 3.88±0.01 <sup>a,B</sup> 3.81±0.03 <sup>b,AB</sup> 3.80±0.06 <sup>b,AB</sup> 4.24±0.01 <sup>a,A</sup> 3.94±0.06 <sup>c,AB</sup> 4.38±0.03 <sup>b,A</sup>	4.98±0.01 <sup>a,A</sup> 4.35±0.04 <sup>b,A</sup> 4.33±0.08 <sup>b,A</sup> 4.10±0.01 <sup>a,B</sup> 4.11±0.03 <sup>a,AB</sup> 3.88±0.03 <sup>a,B</sup> 4.48±0.01 <sup>a,AB</sup> 4.12±0.04 <sup>b,AB</sup> 4.64±0.06 <sup>a,A</sup>
<b>Moisture content (%)</b> <i>Dry weight base</i> <b>Spruce</b> Fall Winter Spring <b>Hemlock</b> Fall Winter Spring <b>Grassland</b> Fall Winter Spring	274.98±2.94 <sup>a,A</sup> 126.08±1.94 <sup>b,A</sup> 120.50±1.74 <sup>b,AB</sup> 211.99±50.39 <sup>a,AB</sup> 152.23±8.23 <sup>ab,A</sup> 172.18±3.44 <sup>ab,A</sup> 97.63±0.90 <sup>a,B</sup> 52.93±1.11 <sup>b,AB</sup> 94.93±0.31 <sup>a,B</sup>	169.22±5.98 <sup>a,A</sup> 109.41±0.45 <sup>ab,A</sup> 96.25±2.19 <sup>ab,B</sup> 179.43±49.50 <sup>a,A</sup> 97.70±1.35 <sup>b,A</sup> 143.34±3.26 <sup>ab,A</sup> 95.56±0.95 <sup>a,B</sup> 61.47±0.56 <sup>ab,B</sup> 90.94±1.01 <sup>a,B</sup>	82.25±3.59 <sup>ab,A</sup> 101.05±1.17 <sup>a,A</sup> 79.70±0.81 <sup>ab,A</sup> 94.77±51.64 <sup>a,A</sup> 54.88±0.89 <sup>ab,B</sup> 55.81±2.08 <sup>ab,B</sup> 41.52±1.74 <sup>a,B</sup> 42.25±0.81 <sup>a,B</sup> 50.57±2.03 <sup>a,B</sup>

Properties (continued)	Organic layer	Topsoil (0~20 cm)	Subsoil (21~40 cm)
<b>Moisture content (%)</b> <i>Wet weight base</i>			
<b>Spruce</b>			
Fall	67.69±4.08 <sup>a,A</sup>	58.09±0.78 <sup>a,A</sup>	50.74±0.25 <sup>ab,A</sup>
Winter	54.73±0.32 <sup>b,A</sup>	48.57±0.16 <sup>ab,A</sup>	45.94±0.17 <sup>a,A</sup>
Spring	53.88±0.39 <sup>b,AB</sup>	48.11±0.64 <sup>ab,B</sup>	44.31±0.25 <sup>ab,A</sup>
<b>Hemlock</b>			
Fall	71.28±4.19 <sup>a,AB</sup>	50.46±4.88 <sup>a,A</sup>	38.15±4.36 <sup>a,A</sup>
Winter	60.24±1.22 <sup>ab,A</sup>	48.30±0.34 <sup>b,A</sup>	35.32±0.37 <sup>ab,B</sup>
Spring	62.39±0.64 <sup>ab,A</sup>	57.30±0.54 <sup>ab,A</sup>	35.46±0.78 <sup>ab,B</sup>
<b>Grassland</b>			
Fall	38.76±1.33 <sup>a,B</sup>	34.74±0.90 <sup>a,B</sup>	29.08±1.19 <sup>a,B</sup>
Winter	33.62±0.54 <sup>b,AB</sup>	37.48±0.21 <sup>ab,B</sup>	29.68±0.56 <sup>a,B</sup>
Spring	48.06±0.07 <sup>a,B</sup>	47.35±0.29 <sup>a,B</sup>	33.41±0.86 <sup>a,B</sup>
<b>Total organic carbon (%)</b>			
<b>Spruce</b>			
Fall	28.24±0.19 <sup>a,A</sup>	20.87±0.87 <sup>a,A</sup>	16.63±1.56 <sup>b,A</sup>
Winter	27.59±2.03 <sup>a,A</sup>	16.40±0.63 <sup>a,A</sup>	14.30±0.32 <sup>a,A</sup>
Spring	27.80±3.74 <sup>a,A</sup>	14.79±1.17 <sup>a,A</sup>	11.25±0.29 <sup>a,A</sup>
<b>Hemlock</b>			
Fall	32.54±0.23 <sup>a,A</sup>	13.16±0.72 <sup>a,A</sup>	4.01±0.74 <sup>a,A</sup>
Winter	29.10±0.54 <sup>a,A</sup>	15.06±0.36 <sup>ab,A</sup>	4.01±0.16 <sup>b,B</sup>
Spring	30.40±0.57 <sup>a,A</sup>	15.50±1.09 <sup>ab,A</sup>	4.82±0.47 <sup>b,B</sup>
<b>Grassland</b>			
Fall	12.81±1.41 <sup>a,B</sup>	9.34±0.63 <sup>a,B</sup>	6.83±1.31 <sup>b,B</sup>
Winter	6.24±0.76 <sup>b,B</sup>	5.53±0.49 <sup>ab,B</sup>	2.11±0.34 <sup>b,C</sup>
Spring	14.74±2.61 <sup>a,B</sup>	8.16±0.51 <sup>a,B</sup>	4.15±0.14 <sup>a,B</sup>
<b>Total nitrogen (%)</b>			
<b>Spruce</b>			
Fall	1.38±0.03 <sup>a,A</sup>	1.08±0.01 <sup>ab,A</sup>	0.60±0.24 <sup>b,A</sup>
Winter	1.53±0.14 <sup>a,A</sup>	1.54±0.13 <sup>a,A</sup>	1.15±0.11 <sup>b,A</sup>
Spring	1.53±0.21 <sup>a,A</sup>	0.82±0.08 <sup>b,B</sup>	0.60±0.03 <sup>b,A</sup>
<b>Hemlock</b>			
Fall	1.11±0.02 <sup>b,A</sup>	0.67±0.01 <sup>ab,B</sup>	0.24±0.01 <sup>a,AB</sup>
Winter	1.62±0.11 <sup>a,A</sup>	1.01±0.04 <sup>a,B</sup>	0.38±0.01 <sup>a,B</sup>
Spring	1.68±0.10 <sup>a,A</sup>	1.16±0.03 <sup>a,A</sup>	0.35±0.06 <sup>a,B</sup>
<b>Grassland</b>			
Fall	0.25±0.04 <sup>a,B</sup>	0.28±0.05 <sup>a,C</sup>	0.18±0.05 <sup>a,AB</sup>
Winter	0.63±0.09 <sup>a,B</sup>	0.52±0.04 <sup>a,C</sup>	0.27±0.04 <sup>a,B</sup>
Spring	0.69±0.08 <sup>a,B</sup>	0.51±0.03 <sup>a,C</sup>	0.18±0.01 <sup>ab,C</sup>
<b>C/N ratio</b>			
<b>Spruce</b>			
Fall	20.44±6.33 <sup>a,AB</sup>	19.37±8.70 <sup>a,AB</sup>	27.80±6.50 <sup>ab,A</sup>
Winter	20.59±5.89 <sup>a,A</sup>	10.76±2.97 <sup>b,AB</sup>	12.03±2.07 <sup>ab,A</sup>
Spring	16.50±4.51 <sup>b,A</sup>	15.42±3.29 <sup>a,A</sup>	20.86±3.60 <sup>a,A</sup>
<b>Hemlock</b>			
Fall	29.41±1.05 <sup>a,A</sup>	19.63±7.20 <sup>a,A</sup>	16.77±7.40 <sup>a,A</sup>
Winter	18.07±1.76 <sup>b,A</sup>	14.69±1.21 <sup>b,A</sup>	10.33±1.37 <sup>b,A</sup>
Spring	18.25±2.63 <sup>b,A</sup>	13.66±2.11 <sup>b,A</sup>	14.22±3.81 <sup>b,AB</sup>
<b>Grassland</b>			
Fall	51.73±3.52 <sup>a,AB</sup>	33.80±1.26 <sup>a,AB</sup>	37.57±2.62 <sup>b,B</sup>
Winter	10.10±1.75 <sup>b,B</sup>	10.37±1.24 <sup>ab,AB</sup>	8.02±1.47 <sup>b,AB</sup>
Spring	22.84±5.26 <sup>a,B</sup>	16.31±2.09 <sup>a,A</sup>	25.23±5.33 <sup>a,A</sup>

\*The same letter are not significantly different at the 5% level according to Duncan's multiple range test by using MANOVA analysis (n=9).

Capital letter means that comparison by different site and Lower letter means that comparison by different season.



表三、福山森林環境條件及土壤性質

Table 3. Environmental conditions and soil properties of Fu-Shan forest

Properties	Organic layer	Topsoil (0~20 cm)	Subsoil (21~40 cm)
<b>Altitude (m)</b>	500	500	500
<b>Annual precipitation (mm)</b>	3660 (avg.)	3660 (avg.)	3660 (avg.)
<b>Soil texture</b> Valley Middle-slope Ridge	Lithosols, stony loam Colluviums, stony loam Yellow soils, stony loam		
<b>Vegetation</b> Valley Middle-slope Ridge	Mixed evergreen trees, bushes, and ferns.		
<b>Soil Color</b> Valley Middle-slope Ridge	Blackish brown	Blackish to brownish red	Brownish to yellowish red
<b>Atmospheric temperature (°C)</b> Valley Middle-slope Ridge	17.0 <sup>b</sup> (Fall)---12.4 <sup>c</sup> (Winter)---23.0 <sup>a</sup> (Spring) 16.7 <sup>b</sup> (Fall)---13.3 <sup>c</sup> (Winter)---22.3 <sup>a</sup> (Spring) 16.5 <sup>b</sup> (Fall)---12.0 <sup>c</sup> (Winter)---21.0 <sup>a</sup> (Spring)		
<b>Soil temperature (°C)</b> Valley Middle-slope Ridge	17.4 <sup>a</sup> (Fall)---11.3 <sup>c</sup> (Winter)---16.2 <sup>ab</sup> (Spring) 17.8 <sup>a</sup> (Fall)---13.1 <sup>c</sup> (Winter)---15.2 <sup>ab</sup> (Spring) 17.4 <sup>a</sup> (Fall)---12.1 <sup>c</sup> (Winter)---14.0 <sup>ab</sup> (Spring)		
<b>Light intensity</b> Valley Middle-slope Ridge	402 <sup>b</sup> (Fall)---338 <sup>b</sup> (Winter)---3977 <sup>a</sup> (Spring) 476 <sup>b</sup> (Fall)---2342 <sup>a</sup> (Winter)---2002 <sup>a</sup> (Spring) 743 <sup>b</sup> (Fall)---3183 <sup>a</sup> (Winter)---3520 <sup>a</sup> (Spring)		
<b>pH</b> Valley Fall Winter Spring Middle-slope Fall Winter Spring Ridge Fall Winter Spring	4.40±0.09 <sup>ab,A</sup> 4.61±0.03 <sup>a,A</sup> 4.60±0.03 <sup>a,A</sup> 4.37±0.07 <sup>a,A</sup> 4.23±0.06 <sup>a,B</sup> 3.80±0.01 <sup>b,C</sup> 4.21±0.08 <sup>a,AB</sup> 4.06±0.04 <sup>ab,C</sup> 4.22±0.00 <sup>a,B</sup>	4.20±0.09 <sup>b,A</sup> 4.57±0.07 <sup>a,A</sup> 4.67±0.03 <sup>a,A</sup> 4.04±0.03 <sup>a,AB</sup> 4.11±0.41 <sup>a,B</sup> 3.76±0.01 <sup>b,C</sup> 4.31±0.04 <sup>a,A</sup> 4.27±0.11 <sup>a,C</sup> 4.13±0.04 <sup>b,B</sup>	4.36±0.13 <sup>a,AB</sup> 4.48±0.03 <sup>a,AB</sup> 4.72±0.03 <sup>b,A</sup> 4.24±0.03 <sup>a,B</sup> 4.32±0.04 <sup>a,B</sup> 3.84±0.01 <sup>b,B</sup> 4.62±0.15 <sup>a,A</sup> 4.54±0.14 <sup>a,A</sup> 4.24±0.01 <sup>b,C</sup>
<b>Moisture content (%)</b> <i>Dry weight base</i> Valley Fall Winter Spring Middle-slope Fall Winter Spring Ridge Fall Winter Spring	125.03±14.82 <sup>b,C</sup> 184.49±3.16 <sup>a,A</sup> 149.60±3.83 <sup>b,B</sup> 222.73±19.01 <sup>a,B</sup> 135.98±1.04 <sup>b,C</sup> 193.41±1.11 <sup>ab,A</sup> 269.34±11.53 <sup>a,A</sup> 152.61±2.90 <sup>c,B</sup> 194.45±1.80 <sup>b,A</sup>	80.32±15.40 <sup>c,C</sup> 157.19±6.08 <sup>a,A</sup> 113.32±2.59 <sup>b,B</sup> 151.09±15.26 <sup>a,A</sup> 107.11±2.01 <sup>b,B</sup> 140.25±1.18 <sup>ab,A</sup> 96.63±5.66 <sup>b,B</sup> 114.68±1.7 <sup>a,A</sup> 112.65±0.88 <sup>a,A</sup>	59.76±11.48 <sup>b,B</sup> 84.96±3.38 <sup>a,A</sup> 82.43±1.65 <sup>a,A</sup> 99.30±13.68 <sup>a,A</sup> 80.47±1.97 <sup>b,B</sup> 88.22±0.88 <sup>a,B</sup> 69.64±3.35 <sup>c,C</sup> 85.76±5.25 <sup>b,B</sup> 100.55±0.67 <sup>a,A</sup> ( to be continue )

Properties(continued)	Organic layer	Topsoil (0~20 cm)	Subsoil (20~40 cm)
<b>Moisture content (%)</b>			
<b>Wet weight base</b>			
<b>Valley</b>			
Fall	54.88±2.68 <sup>b,C</sup>	43.95±5.09 <sup>c,B</sup>	36.90±4.27 <sup>b,B</sup>
Winter	64.71±0.40 <sup>a,A</sup>	61.10±0.93 <sup>a,A</sup>	45.33±1.11 <sup>a,A</sup>
Spring	59.81±0.62 <sup>b,B</sup>	52.92±0.56 <sup>b,B</sup>	44.42±0.55 <sup>a,B</sup>
<b>Middle-slope</b>			
Fall	68.21±1.81 <sup>a,B</sup>	59.93±2.44 <sup>a,A</sup>	48.08±3.02 <sup>a,A</sup>
Winter	57.46±0.20 <sup>b,B</sup>	51.69±0.47 <sup>b,B</sup>	44.29±0.54 <sup>b,A</sup>
Spring	65.49±0.11 <sup>a,A</sup>	58.35±0.21 <sup>a,A</sup>	46.87±0.25 <sup>a,AB</sup>
<b>Ridge</b>			
Fall	72.35±1.18 <sup>a,A</sup>	48.84±1.59 <sup>b,B</sup>	41.02±1.14 <sup>c,B</sup>
Winter	60.15±0.46 <sup>b,AB</sup>	52.85±0.48 <sup>a,B</sup>	46.08±1.51 <sup>b,A</sup>
Spring	65.80±0.19 <sup>ab,A</sup>	52.97±0.19 <sup>a,B</sup>	48.13±0.23 <sup>a,A</sup>
<b>Total organic carbon (%)</b>			
<b>Valley</b>			
Fall	21.45±1.20 <sup>c,A</sup>	11.77±1.15 <sup>a,A</sup>	6.41±1.29 <sup>a,B</sup>
Winter	15.81±1.93 <sup>a,B</sup>	10.32±0.38 <sup>a,A</sup>	5.59±0.84 <sup>b,A</sup>
Spring	17.69±1.63 <sup>a,B</sup>	8.01±0.12 <sup>b,A</sup>	5.03±0.97 <sup>b,A</sup>
<b>Middle-slope</b>			
Fall	32.14±1.64 <sup>b,A</sup>	11.73±1.18 <sup>a,A</sup>	8.47±0.86 <sup>a,A</sup>
Winter	12.39±1.15 <sup>b,B</sup>	7.61±0.56 <sup>c,B</sup>	3.15±0.28 <sup>b,B</sup>
Spring	15.78±1.79 <sup>b,B</sup>	9.63±0.49 <sup>b,A</sup>	3.74±0.30 <sup>b,B</sup>
<b>Ridge</b>			
Fall	41.18±3.78 <sup>a,A</sup>	10.71±0.28 <sup>b,B</sup>	6.27±0.87 <sup>a,B</sup>
Winter	11.28±0.34 <sup>b,B</sup>	6.78±0.38 <sup>a,B</sup>	3.92±0.61 <sup>b,B</sup>
Spring	14.29±0.75 <sup>b,B</sup>	6.49±0.34 <sup>a,B</sup>	2.41±0.48 <sup>b,C</sup>
<b>Total nitrogen (%)</b>			
<b>Valley</b>			
Fall	0.63±0.17 <sup>b,C</sup>	0.43±0.03 <sup>c,B</sup>	0.27±0.10 <sup>a,A</sup>
Winter	0.88±0.12 <sup>a,A</sup>	0.69±0.09 <sup>a,B</sup>	0.34±0.17 <sup>a,A</sup>
Spring	0.90±0.09 <sup>a,A</sup>	0.50±0.01 <sup>b,B</sup>	0.26±0.05 <sup>b,B</sup>
<b>Middle-slope</b>			
Fall	0.87±0.08 <sup>a,A</sup>	0.60±0.03 <sup>a,A</sup>	0.28±0.02 <sup>a,A</sup>
Winter	0.78±0.01 <sup>b,B</sup>	0.52±0.09 <sup>b,A</sup>	0.27±0.06 <sup>b,B</sup>
Spring	0.91±0.06 <sup>a,A</sup>	0.61±0.05 <sup>a,A</sup>	0.23±0.02 <sup>c,C</sup>
<b>Ridge</b>			
Fall	0.71±0.04 <sup>ab,B</sup>	0.39±0.13 <sup>b,B</sup>	0.18±0.05 <sup>b,B</sup>
Winter	0.87±0.09 <sup>a,B</sup>	0.56±0.02 <sup>a,B</sup>	0.39±0.03 <sup>a,A</sup>
Spring	0.88±0.07 <sup>a,A</sup>	0.39±0.06 <sup>b,C</sup>	0.32±0.02 <sup>a,A</sup>
<b>C/N ratio</b>			
<b>Valley</b>			
Fall	33.72±19.67 <sup>a,B</sup>	26.24±9.15 <sup>a,A</sup>	13.15±6.32 <sup>b,B</sup>
Winter	18.45±4.40 <sup>b,A</sup>	15.27±2.16 <sup>b,B</sup>	17.68±12.59 <sup>a,B</sup>
Spring	21.55±12.82 <sup>b,A</sup>	12.10±5.14 <sup>b,B</sup>	16.27±7.64 <sup>a,A</sup>
<b>Middle-slope</b>			
Fall	22.60±2.31 <sup>b,C</sup>	28.54±11.89 <sup>a,A</sup>	12.47±3.05 <sup>b,B</sup>
Winter	17.99±9.40 <sup>b,A</sup>	23.94±13.16 <sup>a,A</sup>	23.13±15.07 <sup>a,A</sup>
Spring	28.47±8.22 <sup>a,A</sup>	25.72±14.75 <sup>a,A</sup>	14.60±3.40 <sup>b,B</sup>
<b>Ridge</b>			
Fall	48.02±12.72 <sup>a,A</sup>	15.50±2.37 <sup>a,B</sup>	17.38±3.59 <sup>a,A</sup>
Winter	12.98±1.91 <sup>b,B</sup>	11.21±1.52 <sup>b,B</sup>	9.74±2.30 <sup>b,B</sup>
Spring	16.41±7.57 <sup>b,B</sup>	9.98±2.87 <sup>b,B</sup>	6.09±2.49 <sup>b,C</sup>

\*The same letter are not significantly different at the 5% level according to Duncan's multiple range test by using MANOVA analysis (n=9).

Capital letter means that comparison by different site and Lower letter means that comparison by different season.

#### (4).總氮含量

塔塔加與福山土壤總氮含量均以土壤有機層最高，上層次之和下層最低，明顯由上往下遞減，其與枯枝落葉殘體堆積有關。塔塔加草原區總氮含量較其他二區低；雲杉區與鐵杉區總氮含量亦高於福山所有樣區。塔塔加與福山土壤剖面總氮含量以最上層最高。

#### (5).灰分含量

塔塔加與福山土壤灰分含量均以下層最高，上層次之和有機層最低，呈現由上往下遞增趨勢。塔塔加草原區灰分含量較其他二區者高；有機層與土壤上層灰分含量均較低，土壤下層與他區相當。塔塔加雲杉區與鐵杉區因落葉殘體堆積與高山溫度較低導致有機質體不易被分解，灰分明顯較低。塔塔加與福山土壤剖面灰分含量均以最上層最低，由上往下遞增。

#### (6).碳氮比

塔塔加與福山土壤碳氮比以有機層較高。適當的碳氮比影響微生物生長，碳源提供了微生物生長所需能源，氮源則為微生物代謝所需。較適合微生物生長的碳氮比介於 20:1 與 30:1 之間。一般而言，闊葉樹葉碳氮比約在 45 左右，針葉樹葉的碳氮比則較闊葉樹葉略低為 40 左右。碳氮比率高的有機物，其分解速度比碳氮比率低的慢，碳氮比率越高，其分解速度就越慢，碳氮比太高時，會因氮素缺乏，致使微生物無法大量繁殖。

#### (7).氣溫與土溫

塔塔加氣溫受日照影響極大，草原區氣溫較其他二區高；福山氣溫則在中坡測得較高。土溫方面，塔塔加以草原區較高，福山則為稜線較高。

## 2.塔塔加與福山森林土壤微生物生態

塔塔加高山森林和草原區，因海拔較高，其氣溫和土溫皆較低，全年土溫平均 10 左右。塔塔加三樣品區的土溫變化趨勢相當一致；長年土溫皆為 10 左右，其存在的細菌可能以嗜冷菌或耐冷菌為主，然而土壤中真正的嗜冷菌不多，故冬天所存在的菌應以耐冷微生物為主（楊，1998）。福山闊葉林區氣候溫暖潮濕，年平均氣溫 18.2，年降雨天數達 221 日，土層容易蓄積雨水，僅表層氧氣濃度較高，土壤內部還原層，以不消耗氧氣的嫌氣細菌為主，當氧氣消耗殆盡時，起而代之的為嫌氣性細菌。兼氣性細菌能將硝酸轉為游離態氮，如脫氮菌（林，1987）。

#### (1).總菌數含量

塔塔加森林土壤總菌數含量雲杉林、鐵杉林和草原區土壤，其微生物含量三個樣區每克乾重土壤含微生物  $10^5$ - $10^7$ CFU，雲杉林每克乾重有機層土壤含  $2.39 \pm 0.32 \times 10^7$ CFU，上層土壤每克含  $6.62 \pm 0.16 \times 10^6$ CFU，下層土壤含  $2.69 \pm 0.25 \times 10^6$ CFU。鐵杉林每克乾重有機層土壤含  $1.74 \pm 0.08 \times 10^6$ CFU，上層土壤每克含  $7.16 \pm 0.06 \times 10^5$ CFU，下層土壤則為  $3.35 \pm 1.12 \times 10^5$ CFU。草原區每克乾重有機層土壤含  $2.21 \pm 0.43 \times 10^6$

CFU, 上層土壤每克含  $1.61 \pm 0.47 \times 10^6$  CFU, 下層土壤為  $1.61 \pm 0.36 \times 10^5$  CFU。雲杉林土壤有機物含量較高, 故微生物含量較高, 且雲杉林區和鐵杉林區土壤含水量和有機質含量變化較大, 故微生物族群數變化較大。三樣區上層土壤有機物含量較豐富, 微生物族群數亦較下層土壤高。有機層處因為養分豐富, 菌數常高於上下層, 但因常受陽光直接曝曬, 故菌數表現較不穩定, 尤以草原更為明顯(表四)。

表四、塔塔加森林土壤微生物含量

Table 4. Microbial population of Tatachia (CFU/ g dry soil).

Sampling Location	Total count	Actinomycetes	Fungi	Cellolytic microbes	P-solubilizing microbes	N-fixing microbes
<b>Spruce</b>						
Organic	$(2.39 \pm 0.32) \times 10^7$	$(1.70 \pm 0.16) \times 10^4$	$(5.81 \pm 0.33) \times 10^5$	$(1.86 \pm 0.33) \times 10^5$	$(4.46 \pm 0.36) \times 10^5$	$(1.65 \pm 0.22) \times 10^4$
Topsoil	$(6.62 \pm 0.16) \times 10^6$	$(2.00 \pm 0.12) \times 10^3$	$(1.30 \pm 0.15) \times 10^5$	$(3.04 \pm 0.12) \times 10^4$	$(9.64 \pm 0.58) \times 10^4$	$(8.12 \pm 0.64) \times 10^4$
Subsoil	$(2.69 \pm 0.25) \times 10^6$	$(2.78 \pm 0.23) \times 10^3$	$(2.72 \pm 0.07) \times 10^5$	$(3.56 \pm 0.05) \times 10^4$	$(1.93 \pm 0.31) \times 10^5$	$(3.07 \pm 0.32) \times 10^4$
<b>Hemlock</b>						
Organic	$(1.74 \pm 0.08) \times 10^6$	$(3.36 \pm 0.32) \times 10^4$	$(1.19 \pm 0.21) \times 10^4$	$(2.57 \pm 0.13) \times 10^5$	$(3.33 \pm 0.31) \times 10^5$	$(1.34 \pm 0.29) \times 10^4$
Topsoil	$(7.16 \pm 0.06) \times 10^5$	$(2.04 \pm 0.12) \times 10^3$	$(7.51 \pm 0.24) \times 10^4$	$(1.53 \pm 0.15) \times 10^5$	$(1.54 \pm 0.29) \times 10^5$	$(6.78 \pm 0.27) \times 10^4$
Subsoil	$(3.35 \pm 1.12) \times 10^5$	$(5.35 \pm 0.22) \times 10^2$	$(1.68 \pm 0.11) \times 10^3$	$(1.25 \pm 0.08) \times 10^4$	$(8.83 \pm 0.42) \times 10^4$	$(5.46 \pm 0.13) \times 10^4$
<b>Grassland</b>						
Organic	$(2.21 \pm 0.43) \times 10^6$	$(3.19 \pm 0.17) \times 10^3$	$(1.14 \pm 0.15) \times 10^5$	$(4.49 \pm 0.03) \times 10^4$	$(3.43 \pm 0.27) \times 10^5$	$(7.13 \pm 0.10) \times 10^4$
Topsoil	$(1.61 \pm 0.47) \times 10^6$	$(1.59 \pm 0.32) \times 10^3$	$(2.31 \pm 0.27) \times 10^4$	$(2.32 \pm 0.14) \times 10^4$	$(1.37 \pm 0.27) \times 10^5$	$(2.66 \pm 0.46) \times 10^4$
Subsoil	$(1.61 \pm 0.36) \times 10^5$	$(5.79 \pm 0.17) \times 10^3$	$(2.63 \pm 0.21) \times 10^4$	$(8.17 \pm 0.07) \times 10^3$	$(1.65 \pm 0.32) \times 10^5$	$(1.08 \pm 0.18) \times 10^4$

Mean  $\pm$  S.D. (n=9).

福山稜線、中坡和溪谷區土壤, 三個樣區每克乾重土壤含微生物介於  $10^5$ - $10^7$ CFU 之間。稜線區每克乾重有機層土壤含  $6.82 \pm 0.21 \times 10^7$  CFU, 上層土壤含  $6.03 \pm 0.25 \times 10^7$ CFU, 下層土壤則為  $3.15 \pm 0.42 \times 10^6$ CFU。中坡區每克乾重有機層土壤含  $7.32 \pm 0.08 \times 10^7$ CFU, 上層土壤每克含  $5.85 \pm 0.26 \times 10^7$ CFU, 下層土壤則為  $3.23 \pm 1.12 \times 10^7$ CFU。溪谷區有機層土壤每克含  $1.68 \pm 0.12 \times 10^7$ CFU。上層土壤每克含  $1.59 \pm 0.23 \times 10^7$ CFU, 下層土壤為  $1.65 \pm 0.27 \times 10^7$ CFU。稜線區和中坡區林相與植被分佈較豐, 土壤有機物含量較高, 因而微生物含量較溪谷土壤高。三區上層土壤亦因有機物含量較豐富, 微生物族群數也較下層土壤高(表五)。

## (2).放線菌含量

放線菌因具有多種酵素, 可以利用多種物質為碳源及能源, 在土壤養分之循環上佔極重要地位, 以平板法定量放線菌時, 其菌數並不因培養基成分影響, 顯示此類微生物可以利用各種有機養分。森林土壤由於落葉豐, 纖維質有機物含量高, 因而放線菌族群不容忽視。雲

杉林每克乾重有機層土壤含放線菌  $1.70\pm 0.16\times 10^4$  CFU，上層土壤含  $2.00\pm 0.12\times 10^3$  CFU 和下層土壤含  $2.78\pm 0.23\times 10^3$  CFU。鐵杉林每克乾重有機層土壤含放線菌  $3.36\pm 0.32\times 10^4$  CFU，上層土壤含  $2.04\pm 0.12\times 10^3$  CFU，下層土壤含  $5.35\pm 0.22\times 10^2$  CFU。草原區每克乾重有機層土壤含放線菌  $3.19\pm 0.17\times 10^3$  CFU，上層土壤含  $1.59\pm 0.32\times 10^3$  CFU，下層土壤含  $5.79\pm 0.17\times 10^3$  CFU。由於草原區有機碳和總氮量較低，所以放線菌數在三區中較少。三種土壤其放線菌含量差異性不明顯。雲杉林和鐵杉林放線菌數比草原區多。由於森林土壤質地較鬆軟，因而有機層、上層及下層土壤放線菌含量較不明顯，但是仍以上層較下層多(表四)。

表五、福山森林土壤微生物含量

Table 5. Microbial population of Fu-Shan forest (CFU/ g dry soil)

Sampling Location	Total count	Actinomycetes	Fungi	Cellolytic microbes	P-solubilizing microbes	N-fixing microbes
<b>Valley</b>						
Organic	$(1.68\pm 0.12)\times 10^7$	$(1.40\pm 0.13)\times 10^4$	$(2.17\pm 0.15)\times 10^5$	$(3.47\pm 0.32)\times 10^6$	$(1.04\pm 0.16)\times 10^5$	$(1.95\pm 0.02)\times 10^5$
Topsoil	$(1.59\pm 0.23)\times 10^7$	$(2.10\pm 0.27)\times 10^3$	$(1.79\pm 0.23)\times 10^5$	$(1.29\pm 0.22)\times 10^6$	$(5.21\pm 0.38)\times 10^4$	$(1.73\pm 0.44)\times 10^5$
Subsoil	$(1.65\pm 0.27)\times 10^7$	$(2.91\pm 0.34)\times 10^3$	$(1.42\pm 0.12)\times 10^5$	$(1.82\pm 0.13)\times 10^6$	$(3.20\pm 0.22)\times 10^4$	$(1.91\pm 0.22)\times 10^5$
<b>Middle-slope</b>						
Organic	$(7.32\pm 0.08)\times 10^7$	$(9.75\pm 0.19)\times 10^3$	$(4.53\pm 0.28)\times 10^5$	$(1.07\pm 0.16)\times 10^6$	$(1.86\pm 0.13)\times 10^5$	$(6.22\pm 0.39)\times 10^5$
Topsoil	$(5.85\pm 0.26)\times 10^6$	$(3.31\pm 0.33)\times 10^3$	$(2.10\pm 0.22)\times 10^5$	$(5.46\pm 0.19)\times 10^5$	$(9.41\pm 0.24)\times 10^4$	$(2.03\pm 0.37)\times 10^5$
Subsoil	$(3.23\pm 1.12)\times 10^6$	$(2.27\pm 0.17)\times 10^3$	$(5.64\pm 0.21)\times 10^4$	$(2.88\pm 0.18)\times 10^5$	$(4.07\pm 0.62)\times 10^4$	$(2.70\pm 0.24)\times 10^5$
<b>Ridge</b>						
Organic	$(6.82\pm 0.21)\times 10^7$	$(3.63\pm 0.28)\times 10^3$	$(2.13\pm 0.32)\times 10^5$	$(2.43\pm 0.02)\times 10^6$	$(1.97\pm 0.19)\times 10^5$	$(1.29\pm 0.21)\times 10^6$
Topsoil	$(6.03\pm 0.25)\times 10^7$	$(1.37\pm 0.12)\times 10^3$	$(9.90\pm 0.13)\times 10^4$	$(1.68\pm 0.13)\times 10^6$	$(1.41\pm 0.28)\times 10^5$	$(1.14\pm 0.22)\times 10^6$
Subsoil	$(3.15\pm 0.42)\times 10^6$	$(6.68\pm 0.23)\times 10^2$	$(4.00\pm 0.24)\times 10^4$	$(2.40\pm 0.35)\times 10^6$	$(7.00\pm 0.22)\times 10^4$	$(5.45\pm 0.21)\times 10^5$

Mean  $\pm$  S.D. (n=9).

福山稜線區每克乾重有機層土壤含放線菌  $3.63\pm 0.28\times 10^3$  CFU，上層土壤含  $1.37\pm 0.12\times 10^3$  CFU 和下層土壤含  $6.68\pm 0.23\times 10^2$  CFU。中坡區每克乾重有機層土壤含放線菌  $9.75\pm 0.19\times 10^3$  CFU，上層土壤含  $3.31\pm 0.33\times 10^3$  CFU 和下層土壤含  $2.27\pm 0.17\times 10^3$  CFU。溪谷區每克乾重有機層土壤含放線菌  $1.40\pm 0.13\times 10^4$  CFU，上層土壤每克含  $2.10\pm 0.27\times 10^3$  CFU 和下層土壤含  $2.91\pm 0.34\times 10^3$  CFU。秋季溪谷區的菌相明顯較其他兩區高，可能是因為該區 pH 值較其他區高有關，放線菌數和氫離子濃度成正比 (林, 1987) (表五)。福山與塔塔加森林土壤 pH 值大部分為酸性，每克乾重土壤放線菌菌數大都介於  $10^3$ - $10^4$  CFU，少於細菌和真菌族群。

### (3). 真菌數含量

塔塔加高山森林土壤有機物含量高，年平均溫度只有10℃，有機物易堆積，土壤pH呈酸性，有利真菌族群建立。雲杉林每克乾重有機層土壤含真菌 $5.81\pm 0.33\times 10^5$ CFU，上層土壤含 $1.30\pm 0.15\times 10^5$ CFU，和下層土壤含 $2.72\pm 0.07\times 10^5$ CFU。鐵杉林每克乾重有機層土壤含真菌 $1.19\pm 0.21\times 10^4$ CFU，上層土壤每克含 $7.51\pm 0.24\times 10^4$ CFU，和下層土壤含 $1.68\pm 0.11\times 10^3$ CFU。草原區每克乾重有機層土壤含真菌 $1.14\pm 0.15\times 10^5$ CFU，上層土壤含 $2.31\pm 0.27\times 10^4$ CFU，和下層土壤為 $2.63\pm 0.21\times 10^4$ CFU。下層有機物含量少以及通氣情形低，所以真菌的族群數較上層少。草原區有機碳和總氮量較低，故真菌菌數在三區中較少。在有機層方面，草原區和鐵杉林區亦呈現較高的菌數。由於真菌行異營生活方式，決定其生長情形為可被氧化之含碳化合物(oxidizable carbonaceous substances)含量的多寡。雲杉林有機層和上層菌數差異並不明顯，可能雲杉林的有機層腐植質含量較高，土壤性質較疏鬆，通氣性較良好，有機層和上層土壤分界較不明顯，所以菌數上差異不顯著(表四)。

福山稜線區每克乾重有機層土壤含真菌 $2.13\pm 0.32\times 10^5$ CFU，上層土壤含 $9.90\pm 0.13\times 10^4$ CFU和下層土壤含 $4.00\pm 0.24\times 10^4$ CFU。中坡區每克乾重有機層土壤含真菌 $4.53\pm 0.28\times 10^5$ CFU，上層土壤含 $2.10\pm 0.22\times 10^5$ CFU和下層土壤則為 $5.64\pm 0.21\times 10^4$ CFU。溪谷區每克乾重有機層土壤含真菌 $2.17\pm 0.15\times 10^5$ CFU，上層土壤含 $1.79\pm 0.23\times 10^5$ CFU和下層土壤為 $1.42\pm 0.12\times 10^5$ CFU。由於福山土質較黏重，分層明顯，通透性、水分含量上下層差異大，在菌數方面可明顯的看出有機層大於上層，上層大於下層(表五)。

#### (4).纖維素分解菌含量

塔塔加雲杉林每克乾重有機層土壤含纖維素分解菌 $1.86\pm 0.33\times 10^5$ CFU，上層土壤含 $3.04\pm 0.12\times 10^4$ CFU和下層土壤含 $3.56\pm 0.05\times 10^4$ CFU，鐵杉林每克乾重有機層土壤含纖維素分解菌 $2.57\pm 0.13\times 10^5$ CFU，上層含 $1.53\pm 0.15\times 10^5$ CFU和下層土壤含 $1.25\pm 0.08\times 10^4$ CFU。草原區每克乾重有機層土壤含纖維素分解菌 $4.49\pm 0.03\times 10^4$ CFU。上層土壤含 $2.32\pm 0.14\times 10^4$ CFU和下層土壤為 $8.17\pm 0.07\times 10^3$ CFU。纖維素分解活性微生物菌落數與土表植物殘體之數量相關，塔塔加森林土表終年均含有多量纖維質枯落物，所以具有分解纖維素能力的微生物數量高，三種不同林相其土壤中所含具纖維素分解活性微生物含量以雲杉林含量最高，鐵杉林次之，草原區最低，因為草原區的落葉和有機物累積較少(表四)。

福山稜線區每克乾重有機層土壤含纖維素分解菌 $2.43\pm 0.02\times 10^6$ CFU，上層土壤含 $1.68\pm 0.13\times 10^6$ CFU和下層土壤含 $2.40\pm 0.35\times 10^6$ CFU，中坡區每克乾重有機層土壤含纖維素分解菌 $1.07\pm 0.16\times 10^6$ CFU，上層土壤含 $5.46\pm 0.19\times 10^5$ CFU和下層土壤則為 $2.88\pm 0.18\times 10^5$ CFU。溪谷區每克乾重有機層土壤含纖維素分解菌 $3.47\pm 0.32\times 10^6$ CFU。上層土壤含

$1.29 \pm 0.22 \times 10^6$ CFU 和下層土壤含  $1.82 \pm 0.13 \times 10^6$ CFU(表五)。塔塔加草原和福山三樣區間的菌數，草原區因為缺乏成林，太陽直射，溫度較高，纖維分解菌數變化和福山中低海拔林區的變化類似，可知溫度會影響纖維素分解菌菌數變化。

#### (5).溶磷菌菌數含量

塔塔加雲杉林每克乾重有機層土壤含溶磷菌  $4.46 \pm 0.36 \times 10^5$ CFU，上層土壤含  $9.64 \pm 0.58 \times 10^4$ CFU 和下層土壤含  $1.93 \pm 0.31 \times 10^5$ CFU。鐵杉林每克乾重有機層土壤含溶磷菌  $3.33 \pm 0.31 \times 10^5$ CFU，上層土壤含  $1.54 \pm 0.29 \times 10^5$ CFU 和下層土壤含  $8.83 \pm 0.42 \times 10^4$ CFU。草原區每克乾重有機層土壤含溶磷菌  $3.43 \pm 0.27 \times 10^5$ CFU，上層土壤含  $1.37 \pm 0.27 \times 10^5$ CFU 和下層土壤為  $1.65 \pm 0.32 \times 10^5$ CFU。就菌數含量而言，三種林相彼此差異不大(表四)。

福山稜線區每克乾重有機層土壤含溶磷菌  $1.97 \pm 0.19 \times 10^5$ CFU，上層土壤含  $1.41 \pm 0.28 \times 10^5$ CFU 和下層土壤含  $7.00 \pm 0.22 \times 10^4$ CFU，中坡區每克乾重有機層土壤含溶磷菌  $1.86 \pm 0.13 \times 10^5$ CFU，上層土壤含  $9.41 \pm 0.24 \times 10^4$ CFU 和下層土壤含  $4.07 \pm 0.62 \times 10^4$ CFU。溪谷區每克乾重有機層土壤含溶磷菌  $1.04 \pm 0.16 \times 10^5$ CFU，上層土壤含  $5.21 \pm 0.38 \times 10^4$ CFU 和下層土壤為  $3.20 \pm 0.22 \times 10^4$ CFU(表五)。

#### (6).固氮菌菌數含量

森林土壤氮素來源主要來自大氣沉降物、落葉分解及固定大氣中氮素。平板法所培養出來的固氮菌主要為非共生性固氮菌。一般認為非共生性固氮作用在自然界氮素循環上具有極重要的地位，對於流失的氮素回歸土壤，以及氮素在生物物質化學上平衡有其不可或缺重要性。雲杉林每克乾重有機層土壤含固氮菌  $1.65 \pm 0.22 \times 10^4$ CFU，上層土壤含  $8.12 \pm 0.64 \times 10^4$ CFU 和下層土壤含  $3.07 \pm 0.32 \times 10^4$ CFU；鐵杉林每克乾重有機層土壤含固氮菌  $1.34 \pm 0.29 \times 10^4$ CFU，上層土壤含  $6.78 \pm 0.27 \times 10^4$ CFU 和下層土壤含  $5.46 \pm 0.13 \times 10^4$ CFU；草原區每克乾重有機層土壤含固氮菌  $7.13 \pm 0.10 \times 10^4$ CFU，上層土壤每克含  $2.66 \pm 0.46 \times 10^4$ CFU 和下層土壤含  $1.08 \pm 0.18 \times 10^4$ CFU(表四)。

福山稜線區每克乾重有機層土壤含固氮菌  $1.29 \pm 0.21 \times 10^6$ CFU，上層土壤含  $1.14 \pm 0.22 \times 10^6$ CFU 和下層土壤含  $5.45 \pm 0.21 \times 10^5$ CFU，中坡區每克乾重有機層土壤含固氮菌  $6.22 \pm 0.39 \times 10^5$ CFU，上層土壤含  $2.03 \pm 0.37 \times 10^5$ CFU，下層土壤則為  $2.70 \pm 0.24 \times 10^5$ CFU。溪谷區每克乾重有機層土壤含固氮菌  $1.95 \pm 0.02 \times 10^5$ CFU。上層土壤含  $1.73 \pm 0.44 \times 10^5$ CFU 和下層土壤為  $1.91 \pm 0.22 \times 10^5$ CFU(表五)。在大部分樣區中福山固氮菌數大於塔塔加，可能福山的溫度、落葉量或其他養分來源等較塔塔加高，或是福山的植被較豐、根系較發達，使固氮菌數量亦相對的增加。

### 3.土壤剖面微生物數目之變化

測定草原土壤剖面其微生物變化，最上層(O層)有機質含量高，其細菌數、放線菌數、真菌數、具纖維質分解活性菌、溶磷菌和固氮菌含量皆最高，隨著剖面深度增加，其菌數含量皆下降(表六)。福山稜線土壤剖面，由上層剖面Oa層至最下層Bc層，菌數變化隨著剖面深度大幅下降。稜線區和草原剖面一區因為坡度較大，水分、養分流失較快，雖著深度增加，菌數快速銳減。福山剖面的菌數較塔塔加剖面高，其變化也較大(表七)。

表六、塔塔加森林土壤草原土壤剖面微生物含量

Table 6. Microbial population of soil profile in grassland of Tatachia (CFU/ g dry soil)

Sampling Location	Total count	Actinomycetes	Fungi	Cellolytic microbes	P-solubilizing microbes	N-fixing microbes
O horizon	$(1.66 \pm 0.15) \times 10^6$	$(8.69 \pm 0.08) \times 10^2$	$(2.35 \pm 0.26) \times 10^3$	$(4.24 \pm 0.03) \times 10^5$	$(8.74 \pm 0.21) \times 10^4$	$(1.86 \pm 0.32) \times 10^4$
Oa horizon	$(6.29 \pm 0.23) \times 10^5$	$(6.41 \pm 0.09) \times 10^2$	$(2.55 \pm 0.18) \times 10^3$	$(2.30 \pm 0.12) \times 10^5$	$(3.77 \pm 0.18) \times 10^4$	$(3.01 \pm 0.07) \times 10^4$
A horizon	$(2.92 \pm 0.11) \times 10^5$	$(6.87 \pm 0.05) \times 10^2$	$(7.00 \pm 0.32) \times 10^2$	$(2.07 \pm 0.04) \times 10^5$	$(3.44 \pm 0.24) \times 10^4$	$(2.17 \pm 0.31) \times 10^4$
BW1 horizon	$(2.22 \pm 0.13) \times 10^5$	$(8.35 \pm 0.11) \times 10^2$	$(8.59 \pm 0.12) \times 10^2$	$(1.48 \pm 0.12) \times 10^5$	$(6.58 \pm 0.13) \times 10^4$	$(1.64 \pm 0.42) \times 10^4$
BW2 horizon	$(3.54 \pm 0.05) \times 10^5$	$(6.96 \pm 0.12) \times 10^2$	$(8.50 \pm 0.23) \times 10^3$	$(7.62 \pm 0.09) \times 10^4$	$(2.46 \pm 0.03) \times 10^5$	$(5.01 \pm 0.26) \times 10^4$

Mean  $\pm$  S.D. (n=9)

表七、福山森林土壤背脊土壤剖面微生物含量

Table 7. Microbial population of soil profile in ridge of Fu-Shan forest (CFU/g dry soil)

Sampling Location	Total count	Actinomycetes	Fungi	Cellolytic microbes	P-solubilizing microbes	N-fixing microbes
OA horizon	$(4.75 \pm 0.19) \times 10^6$	$(2.66 \pm 0.08) \times 10^3$	$(9.45 \pm 0.23) \times 10^4$	$(9.33 \pm 0.13) \times 10^4$	$(4.75 \pm 0.25) \times 10^4$	$(2.18 \pm 0.14) \times 10^5$
A horizon	$(2.99 \pm 0.17) \times 10^6$	$(1.35 \pm 0.19) \times 10^3$	$(8.92 \pm 0.28) \times 10^4$	$(4.88 \pm 0.19) \times 10^4$	$(3.24 \pm 0.27) \times 10^4$	$(5.23 \pm 0.18) \times 10^4$
BW1 horizon	$(1.66 \pm 0.11) \times 10^6$	$(3.69 \pm 0.13) \times 10^2$	$(5.86 \pm 0.12) \times 10^4$	$(3.51 \pm 0.14) \times 10^4$	$(3.18 \pm 0.34) \times 10^4$	$(2.49 \pm 0.21) \times 10^4$
BW2 horizon	$(7.00 \pm 0.23) \times 10^5$	$(5.60 \pm 0.17) \times 10^2$	$(3.88 \pm 0.26) \times 10^4$	$(1.49 \pm 0.02) \times 10^4$	$(2.19 \pm 0.73) \times 10^4$	$(3.88 \pm 0.17) \times 10^4$
BC horizon	$(4.53 \pm 0.03) \times 10^5$	$(1.81 \pm 0.18) \times 10^2$	$(1.45 \pm 0.15) \times 10^4$	$(1.86 \pm 0.15) \times 10^4$	$(1.22 \pm 0.13) \times 10^4$	$(2.22 \pm 0.32) \times 10^4$

Mean  $\pm$  S.D. (n=9)

#### 4. 微生物生物質量之變化

利用氯仿燻蒸萃取法(fumigation-extraction method)測定土壤微生



物生物質量(biomass)。微生物生質碳含量方面，有機質層之生質碳含量以雲杉林最高，為  $1182.73 \pm 142.14 \mu\text{g-C/g dry soil}$ ，鐵杉林次之而草原最低，分別為  $933.54 \pm 64.25$  及  $886.35 \pm 89.14 \mu\text{g-C/g dry soil}$ ；土壤方面，土壤上層亦以雲杉林最高，為  $1008.75 \pm 211.98 \mu\text{g-C/g dry soil}$ ，鐵杉林次之而草原最低，分別為  $746.85 \pm 132.63$  及  $658.23 \pm 103.48 \mu\text{g-C/g dry soil}$ ，顯示雲杉林區土壤微生物較活躍。至於微生物生質氮含量方面，呈現和生質碳相同趨勢，有機質層之生質氮含量以雲杉林最高，為  $166.36 \pm 13.82 \mu\text{g-N/g dry soil}$ ，鐵杉林次之而草原最低，分別為  $145.85 \pm 10.42$  及  $133.28 \pm 12.53 \mu\text{g-N/g dry soil}$ ；土壤方面，土壤上層亦以雲杉林最高，為  $154.27 \pm 9.36 \mu\text{g-N/g dry soil}$ ，鐵杉林次之而草原最低，分別為  $132.48 \pm 9.84$  及  $109.47 \pm 19.42 \mu\text{g-N/g dry soil}$ ；同林相的下層土壤無論微生物生質碳和氮含量皆比上層低(表八)。草原剖面之微生物生質碳與生質氮含量方面，以 O 層土壤最高。主要為 O 層土壤有機質含量高，通氣狀況佳，碳氮大量流通，因而微生物活性高，由上層至下層呈遞減狀態(表九)。

表八、塔塔加森林土壤微生物生質量

Table 8. Soil microbial biomass of Tatachia forest

Properties	Biomass carbon ( $\mu\text{g C/g}$ )	Biomass nitrogen ( $\mu\text{g N/g}$ )
<b>Spruce</b>		
Organic layer	$1182.73 \pm 142.14$	$166.36 \pm 13.82$
Topsoil	$1008.75 \pm 211.98$	$154.27 \pm 9.36$
Subsoil	$783.52 \pm 89.38$	$93.42 \pm 16.14$
<b>Hemlock</b>		
Organic layer	$933.54 \pm 64.25$	$145.85 \pm 10.42$
Topsoil	$746.85 \pm 132.63$	$132.48 \pm 9.84$
Subsoil	$557.27 \pm 90.37$	$71.23 \pm 9.25$
<b>Grassland</b>		
Organic layer	$886.35 \pm 89.14$	$133.28 \pm 12.53$
Topsoil	$658.23 \pm 103.48$	$109.47 \pm 19.42$
Subsoil	$425.93 \pm 65.29$	$63.82 \pm 10.28$

福山有機質層生質碳含量方面，溪谷區最低，為  $375.28 \pm 20.96 \mu\text{g-C/g dry soil}$ ，稜線區和中坡區分別為  $526.37 \pm 20.53$  及  $427.58 \pm 23.38 \mu\text{g-C/g dry soil}$ 。同林相下層土壤無論微生物生質碳和氮含量，皆比上層低。至於微生物生質氮含量方面，亦以溪谷區最低，為  $175.94 \pm 8.49 \mu\text{g-N/g dry soil}$ ，稜線區和中坡區分別為  $264.80 \pm 20.45$  及  $228.96 \pm 7.95 \mu\text{g-N/g dry soil}$ (表十)。稜線剖面方面生質碳及氮含量，皆以最上層為

最高，生質碳及氮含量由上層至下層遞減(表十一)。

表九、塔塔加森林土壤草原剖面微生物生質量

Table 9. Soil microbial biomass of grassland profile in Tatachia forest

Profile	Biomass carbon ( $\mu\text{g C/g}$ )	Biomass nitrogen ( $\mu\text{g N/g}$ )
O horizon	772.48 $\pm$ 31.56	91.35 $\pm$ 9.32
Oa horizon	521.38 $\pm$ 44.86	53.23 $\pm$ 8.37
A horizon	404.56 $\pm$ 25.63	48.26 $\pm$ 8.91
BW1 horizon	212.78 $\pm$ 32.35	28.42 $\pm$ 9.18
BW2 horizon	188.47 $\pm$ 23.75	19.53 $\pm$ 3.12

表十、福山森林土壤微生物生質量

Table 10. Soil microbial biomass of Fu-Shan forest

Properties	Biomass carbon ( $\mu\text{g C/g}$ )	Biomass nitrogen ( $\mu\text{g N/g}$ )
<b>Valley</b>		
Organic layer	375.28 $\pm$ 20.96	175.94 $\pm$ 8.49
Topsoil	319.49 $\pm$ 9.84	189.04 $\pm$ 9.40
Subsoil	196.84 $\pm$ 8.73	113.42 $\pm$ 12.05
<b>Middle-slope</b>		
Organic layer	427.58 $\pm$ 23.38	228.96 $\pm$ 7.95
Topsoil	229.32 $\pm$ 9.48	129.53 $\pm$ 9.89
Subsoil	117.93 $\pm$ 19.74	45.38 $\pm$ 10.42
<b>Ridge</b>		
Organic layer	526.37 $\pm$ 20.53	264.80 $\pm$ 20.45
Topsoil	354.95 $\pm$ 19.85	132.53 $\pm$ 1.56
Subsoil	243.14 $\pm$ 10.63	60.84 $\pm$ 6.94

## 5. 從 DNA 中比較土壤微生物族群

### (1). DNA 萃取及純化方法

利用塔塔加山區雲杉林有機層土壤進行不同萃取與純化方法之比較。其 pH 值約 4.32-4.66，屬酸性土壤，總有機碳和總氮量分別為 27.59-29.49 % 和 1.42-1.53 %。  $A_{260}/A_{280}$  比率介於 1.7 和 1.99 間表示所萃取 DNA 越純，蛋白質污染較少。而  $A_{260}/A_{230}$  的比率越高，表示

腐質酸的干擾較少。一般認為其比率應在 1.2 以上始可避免腐植酸的影響(Zhou 等, 1996)。如表十二所示, 五種方法中, E 法有最高產量,  $A_{260}/A_{280}$ 、 $A_{260}/A_{230}$  的比率最高。而五種方法所萃取 DNA 因為皆未使用物理性破壞, 其 DNA 片段較無 “ smeared ” 現象(圖一) Krsek(1999) 利用 E 法其土壤 pH 值約 6.5-6.8, 屬微酸偏中性土壤,  $A_{260}/A_{280}$  比率和塔塔加雲杉上層(以 E 法萃得: DNA yields 為  $45.51 \mu\text{g/g dry soil}$ ;  $A_{260}/A_{280}=1.91$ ;  $A_{260}/A_{230}=1.33$ )相近, 約 1.8(洪, 2001), 但是  $A_{260}/A_{230}$  比率卻比塔塔加土樣高, 其值約 1.7, 可能塔塔加酸性土壤中的腐植酸含量比微酸偏中性土壤多所造成。塔塔加雲杉有機層腐植酸高於上層土壤, 故所得的純度與產率並不高。DNA 產率高低和土質及萃取方法有關, 並非絕對的數值, 且大部分的 DNA 萃取方法僅適用於少數土類。不同萃取方法間無法作精確 DNA 含量評估(Cullen 和 Hirsch, 1998)。Lloyd 和 Hunter (2001) 在紐西蘭以不同方法萃取四種不同的土壤 DNA, 其產率介於  $11.2\pm 0.83 \mu\text{g/g dry soil}$  和  $299.7\pm 33.1 \mu\text{g/g dry soil}$  間。塔塔加與福山的土壤 DNA 產率則介於  $5.12\pm 0.23 \mu\text{g/g dry soil}$  和  $49.11\pm 33.1 \mu\text{g/g dry soil}$  間, 其變化較小。

表十一、福山森林土壤陵線剖面微生物生質量

Table 11. Soil microbial biomass of ridge profile in Fu-Shan forest

Profile	Biomass carbon ( $\mu\text{g C/g}$ )	Biomass nitrogen ( $\mu\text{g N/g}$ )
OA horizon	$337.53\pm 39.15$	$89.23\pm 9.86$
A horizon	$216.34\pm 12.86$	$35.25\pm 23.52$
BW1 horizon	$129.94\pm 9.77$	$24.76\pm 4.93$
BW2 horizon	$88.45\pm 8.07$	$18.19\pm 1.42$
BC horizon	$54.09\pm 4.65$	$10.34\pm 0.84$

## (2). 不同添加處理 DNA 萃取及純化

利用修正後之 E 法萃取流程進行各種添加處理如下。

### (i). 不同緩衝液影響

純度與產率皆以 Crombach buffer 作 lysis 步驟較佳。樣本取塔塔加雲杉森林土作比較, 有機層因為腐植酸、色素及各種難分解干擾物質的影響, 純度較上層低, 下層因黏土含量較多, 大量的 DNA 會與黏土(clay) 以及沈澱物結合(Ogram *et al.*, 1988), 且下層微生物含量較少, 故純度與產率皆較低(圖二)。

表十二、以不同方法萃取塔塔加雲杉有機層所得 DNA 純度與產率

Table 12. Amount and purity of DNA from Tatachia Spruce organic layer with different extraction and purify methods

Type of method	DNA yields ( $\mu\text{g/g}$ dry soil)	$A_{260}/A_{280}$ Ratio	$A_{260}/A_{230}$ Ratio
Method A	4.36 $\pm$ 0.42	1.23 $\pm$ 0.04	0.92 $\pm$ 0.03
Method B	3.48 $\pm$ 0.19	1.27 $\pm$ 0.03	0.95 $\pm$ 0.01
Method C	24.31 $\pm$ 1.68	1.31 $\pm$ 0.04	0.94 $\pm$ 0.03
Method D	17.80 $\pm$ 0.89	0.92 $\pm$ 0.05	0.89 $\pm$ 0.05
Method E	29.49 $\pm$ 1.05	1.46 $\pm$ 0.08	1.38 $\pm$ 0.02

Means $\pm$ S.D. (n=3).

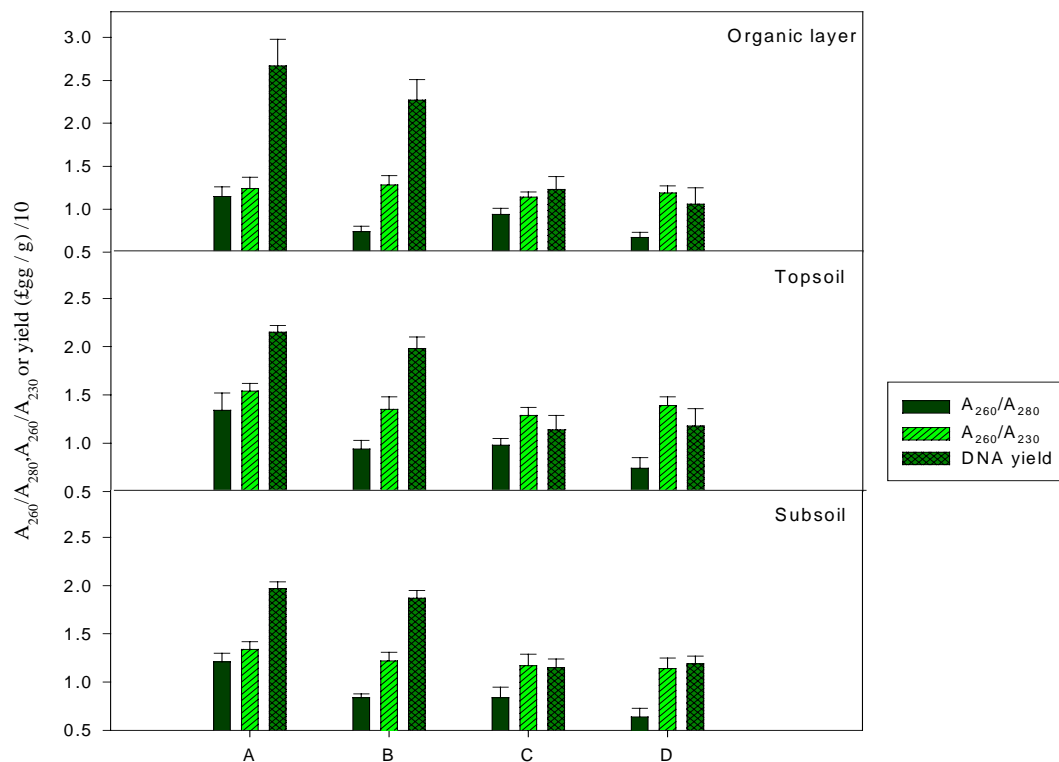


圖一、不同方法萃取塔塔加雲杉有機層 DNA 所得之電泳圖。

Fig. 1. Compare different DNA extraction methods in organic layer of Spruce soil.

(ii).不同前處理方法影響

$\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$  和  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  效果相差不大，添加 50mM 和 100mM 較佳。PVPP 以 1g/ml 效果較好，但產率會大幅減少。上層純度較有機層及下層高，產率則以有機層高於上層及下層(圖三)。



圖二、不同緩衝液效率比較，土樣取自塔塔加雲杉林區。

Fig. 2. Efficiency of DNA extraction with four different buffers: A Crombach buffer, B. TE buffer, C Lysis buffer 1, D Lysis buffer 2. Method E. Samples were take from Spruce forest soil modified the purification method.

### (iii). 酵素對萃取純度與產率的影響

處理效果以 Lysozyme 加 Proteinase K 作用一小時可得到較佳的純度與產率。Juniper (2001) 進行 DNA lysis 培養時間研究中發現其時間越長產率越大，但是 DNA 片段亦會隨作用時間而降解。上層純度較有機層及下層高，產率則以有機層高於上層及下層(圖四)。

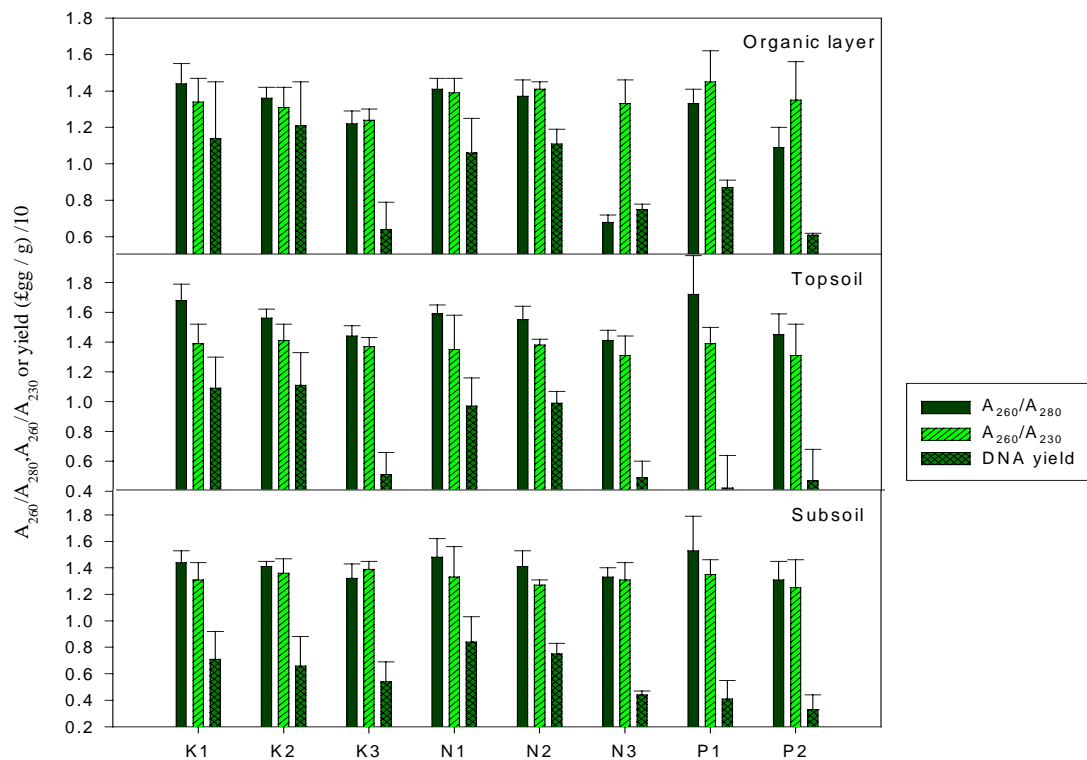
### (iv). 比較不同後處理方法影響

添加 Spermine-HCl 和 PVP 切膠皆能達到較佳的純度，但產率會大幅下降，尤以 PVP 切膠為劇。DNA 產率的降低會使目標基因的 copy number 明顯減少 (Lloyd 和 Hunter, 2001)。上層純度較有機層及下層高，產率則以有機層高於上層及下層(圖五)。

## 6. 以 DGGE 進行微生物多樣性探討

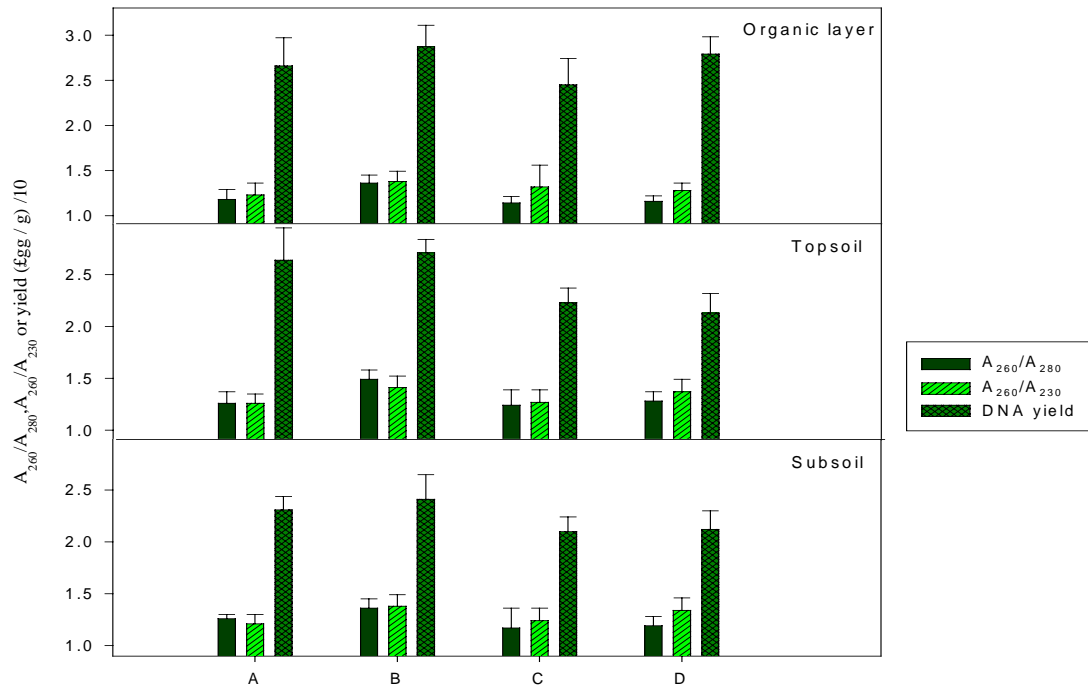
從圖六可以看出有機層 DNA profile 的 band 較多且濃，表示其菌相較豐富，數量亦較上、下層土壤多，此外從溪谷區的上下層土壤 DNA

profile其band十分微弱亦可判斷其微生物數量較少，此結果與平板記數及微生物生質量所得的資訊類似。由不同的土樣其band有相同的位置可以大致判斷其屬於相同的菌群，但是否會因萃取方法或所取土壤不足而導致少量微生物族群因萃取的過程逸失而無法被偵測則不得而知。需以足夠的重複數及較充足的條件進行確認。另外從實驗發現，PCR反應的總體積須小於25  $\mu$  l以縮短反應時間及耗費(Liu等，2001)。為了降低PCR干擾物的影響，可以嘗試將樣品DNA稀釋(Rochelle等，1992)，有機質層的樣品在稀釋到50倍後可被PCR偵測放大，但其PCR產物較少。未來DGGE技術可望成為在微生物生態調查的一項利器。目前仍待克服的問題為不同地區因土質不同，適合的萃取方法亦需修正，有機層干擾尤以塔塔加土壤為重，目前仍無快速的方法可同時提高DNA量與純度。



圖三、不同前處理添加效率比較，土樣取自塔塔加雲杉林區。

Fig. 3. Efficiency of DNA extraction with three prewash treatments ( $AlK(SO_4)_2$  50mM、100mM and 150mM, K1、K2 and K3;  $Al_2(SO_4)_3(NH_4)_2SO_4$  50mM、100mM and 150mM, N1、N2 and N3; PVPP 0.1g/ml and 0.2g/ml, P1 and P2). The purification method was modified by Method E. Samples were taken from Spruce forest soil.



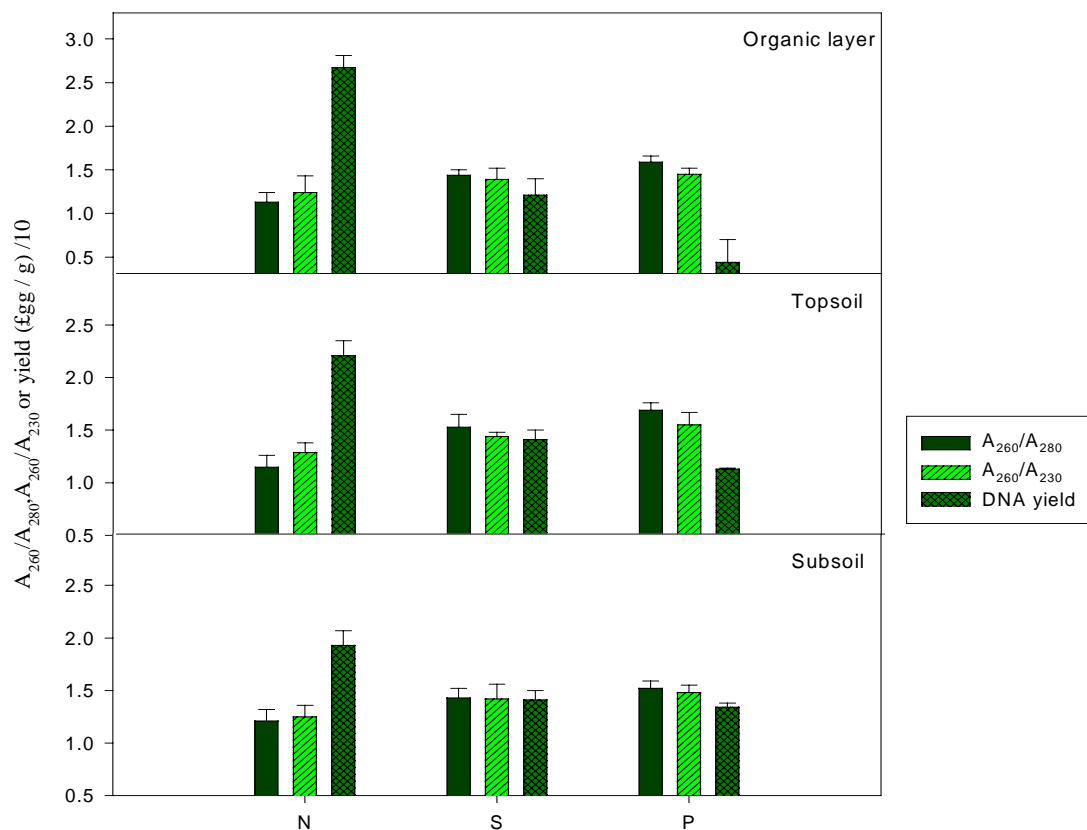
圖四、不同酵素處理效率比較，土樣取自塔塔加雲杉林區。

Fig.4. Efficiency of DNA extraction with two enzymes and two treatment times. (Lysozyme+proteinase k treat 0.5hr and 1hr,A and B ; Lysozyme treat 0.5hr and 1hr,C and D.). The purification method was modified by Method E. The purification method was modified by Method E. Samples were take from Spruce forest soil.

#### 四、結論

塔塔加與福山森林因雨量多故土壤水分含量較高，pH 值介於 3~5 間，皆屬酸性土壤。鐵杉區有機質累積且不易分解，有機層 pH 為所有樣區中最低。塔塔加與福山剖面，pH 值皆以最上層 O 層最低，總有機碳、總氮、各種生質量、菌數皆以最上層 O 層最高，向下遞減。塔塔加與福山森林土壤，不利對酸性耐受度小的放線菌生長，細菌和真菌數量較高為優勢微生物，福山菌數變化較塔塔加大。塔塔加與福山不論土壤層或是剖面，不同季節，其 C/N 比都呈現穩定的趨勢。但福山有機層受季節性枯落葉影響較大。福山菌數變化較塔塔加大。功能性微生物組成中，塔塔加以具纖維素分解活性的微生物數量相較於固氮活性和溶磷活性之微生物為多。福山菌相變化( $10^4$ - $10^7$ )大於塔塔加( $10^5$ - $10^7$ )，其中溶磷菌佔相當高的比例(1.69-64.15%)。微生物生質碳和氮量與核酸量會因不同季節變化而有所變化，其所呈現的變化與平板計數法所得的菌數相近。微生物利用碳率福山以冬天最高，塔塔

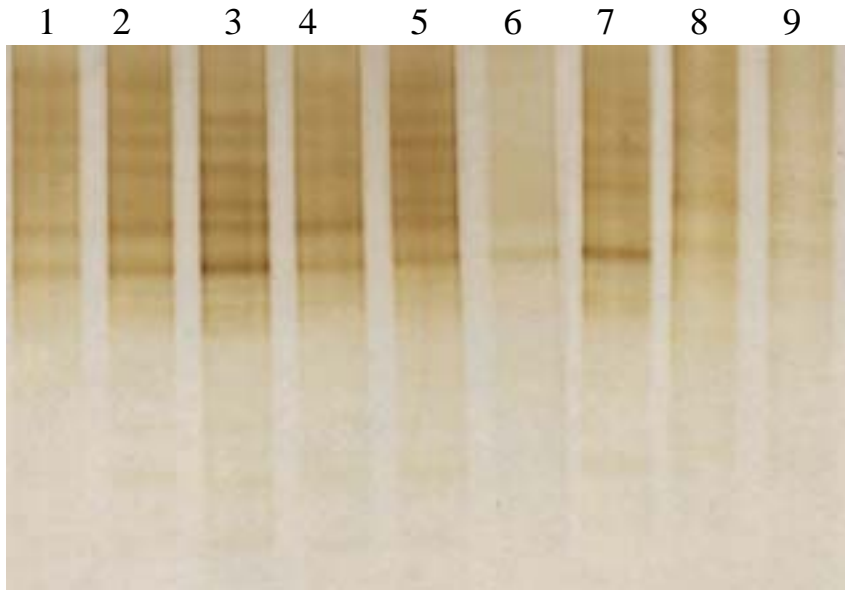
加上下層間反而以冬天最低，微生物利用氮率福山以春天最高，塔塔加則隨季節變異不大。選用修改 Krsek's 方法用來萃取森林土壤 DNA；其中 Lysis 時間延長，添加  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$  50mM、PVPP 1g/ml 前處理，若最後仍無法完全去除雜質，利用 2% PVP 切膠處理，可得較佳萃取效果。選用 Primer FGC 和 NRCG 進行 DGGE 分型，適當膠體梯度範圍約介於 45-75 % 間。從福山 DGGE 圖譜研究發現三區微生物族群分佈類似，但數量以有機層最大，下層最低，溪谷在多樣性或數量皆表現最低。



圖五、不同後處理添加添加效率比較，土樣取自塔塔加雲杉林區。

Fig. 5. Efficiency of DNA extraction with two treatments. N without treatment, S spermine-HCl treatment, P PVP treatment. The purification method was modified by Method E. Samples were taken from Spruce forest soil.





圖六、福山不同森林樣區不同深度土壤微生物 PCR-DGGE 族群圖譜。Band 1, 2, 3 分別代表福山稜線、中坡、溪谷樣區的三處有機層菌相；Band 4, 5, 6 分別代表三處上層菌相，Band 7, 8, 9 分別代表三處下層菌相。

Fig. 6. Comparison of microbial diversity of Fu-Shan forest by PCR-DGGE profile system.

## 五、參考文獻

- 王明光。1999。塔塔加地區森林土生態養分動態及土壤調查(3)。行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告。台北，台灣。
- 宋炯輝。1999。塔塔加地區台灣二葉松造林地的根圈與本體土壤之理化性質與金屬型態分佈。碩士論文。國立台灣大學森林學研究所。台北，台灣。
- 林曜松。2000。生物多樣性研究規劃研討會資料集。p. 1-33。行政院國家科學委員會。台北，台灣。
- 張仲民。1992。普通土壤學。p.1-572。國立編譯館。台北，台灣。
- 楊盛行、孫瓏月、楊鈞凱、魏嘉碧、黃仁勇、許文富。1998。第二核能發電廠及其周圍微生物族群探討。中華民國環境保護學會會誌，21：144-158。
- 楊盛行。1997。台灣北部核能發電廠及火力發電廠周圍微生物生態調查，中華民國微生物學會。台北，台灣。
- 劉有美。2001。森林土壤與肥料，(www.heyuan.gov.cn/nongye/lingxue)。
- Berthelet, M., L. G. Whyte, and C. W. Greer. 1996. Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidone spin columns. FEMS Microbiol Lett 138:17-22.

- Braid, M D., L. M. Daniels, and C. L. Kitts. 2003 Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. *Journal of Microbiological Methods*.52: 389-393.
- Bremner, J. M. and Mulvaney, C. S. 1982. Nitrogen-Total. In : *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. Ed. by Page, A. L. The American Society of Agronomy, Wisconsin. pp. 612.
- Handelsman, J., M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy, and R. M. Goodman. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry and Biology* 5: 245-249.
- Haynes, R. R., 1986. Typification of linnaean species of *Potamogeton* (*Potamogetonaceae*). *Taxon* 35: 563-673.
- Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla, and E. M. Wellington. 1997. Analysis of actinomycine communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3233-3241.
- Hilger, H. A., M. A. Barlaz, and A. G. Wollum, 2000. Landfill methane oxidation response to vegetation, fertilization, and liming. *Journal of Environmental Quality* 29:324-334.
- Holben, W. E. 1994. Isolation and purification of bacterial DNA from soil. *Methods of Soils Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. Madison, USA, Soil Science Society of America: 727-751.
- Juma, N. G., and Paul, E. A. 1981. Use of tracers and computersimulation techniques to assess mineralization and immobilization of soil nitrogen. In: Frissel, M.J. and van Veen, J.A. (Eds.), *Simulation of Nitrogen Behavior of Soil-Plant Systems*. Pudoc, Wageningen: 145-154.
- Krieg, N. R., and J. Döbereiner. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1: 94-104. Williams and Wilkins, Baltimore/ London.
- Krsek, M., and E. M. H. Wellington. 1999. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *Journal of Microbiological Methods* 39:1-16.
- Kuske, C. R., K. Banton, D. L. Adorada, P. C. Stark, K. K. Hill, and P. J. Jackson. 1998. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2463-2472.
- Lee, L. G., 1994. Geographic Origins for the Reptiles on Islands in the Gulf of California, Mexico. *Herpetological Natural History* 2(2): 17-40.
- Lee, K. E., and C. E. Pankhurst. 1992. Soil organisms and sustain-able productivity. *Australian Journal of Soil Research* 30:855-892.
- Liu, W.-T., T. L. Marsh, H. Cheng, and L. J. Forney. 1997. Characterization of

- microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4516-4522.
- Raghubanshi, A. S. 1991. Dynamics of soil biomass C, N, and P in a dry tropical forest in India. *Biology and Fertility of Soils* 12: 55-59.
- Rhoades, J. D. 1982. Soluble salts. In: *Methods of Soil Analysis Part 2 Chemical and Microbiological Properties*' 2nd ed. A. L. Page ed. Academic Press. New York. pp.167-178.
- Ronse, A., L. D. Temmerman, M. Guns, and R. D. Borger. 1988. Evolution of acidity, organic matter content, and CEC in uncultivated soils of North Belgium during the past 25 years, *Soil Science* 146: 453-461.
- Rotthauwe J. H, K. P. Witzel, and W. Liesack. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4704-4712.
- Torsvik, V. L. 1980. Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biology and Biochemistry* 12: 15-21.
- Trevors, J. T., and J. D. van Elsas. 1995. *Nucleic Acids in the Environment-methods and Applications*. p.52. Springer press. Germany.
- Trevors, J. T., J. D. van Elsas, H. Lee, and L. S. van Overbeek 1992. The use of alginate and other carriers for encapsulation of microbial cells for use in soil. *Microbial Releases* 1: 61-69.
- Tsai, Y. L., and B. H. Olson. 1991. Rapid method for extraction of DNA from soil and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1070-1074.
- Vance, E. D., P. C. Brookes, and D. S. Jenkinson. 1987. Microbial biomass measurements in forest soils: determination of K<sub>c</sub> values and tests of hypotheses to explain the failure of the chloroform fumigation-incubation method in acid soils. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 689-696.
- Vance, E. D., P. C. Brookes, and D. S. Jenkinson. 1987. Microbial biomass measurements in forest soils: the use of the chloroform fumigation-incubation method in strongly acid soils. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 697-702.
- Vance, E. D., P. C. Brookes, and D. S. Jenkinson. 1987. A extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 703-707.
- Zhou, J., M. A. Bruns, and J. M. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 316-322.