



國立臺灣大學生命科學院生態學與演化生物學研究所

碩士論文

Institute of Ecology and Evolutionary Biology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

北台灣蚯蚓的功能群與其腸道土壤微生物相

Investigation of functional group of earthworms
and their gut soil microbiome in northern Taiwan

劉韋岑

Wei-Tsen Liu

指導教授：張智涵 博士

楊姍樺 博士

Advisor: Chih-Han Chang, Ph. D.

Shan-Hua Yang, Ph. D.

中華民國 111 年 8 月

August 2022

致謝



此時此刻，著手寫起致謝詞，才比較深刻的意識到即將完結的碩士生涯，三年中遇到了太多我不曾面對的事，學到了恆常不變的是萬變的生活，與其與之抗衡不如學會調適，而我始終相信好的人終究會相聚，這個過程中曾經幫助過我的好人們，在此向你們表達最誠摯的謝意。

謝謝我的指導教授張智涵與楊姍樺博士，在研究路途上為我點了好幾盞明燈，成為我最信任最可靠的後盾，好幾次縈繞在腦海中牽絆著我的問題，都能在你們協助下迎刃而解。

謝謝口試委員許正一博士，在土壤與生態的連結以跳脫性的方式提出見解，推使我以更多面向找尋解答；謝謝口試委員吳羽婷博士，最初提供森林微生物生態的專業知識與實驗設計上的幫助，也在論文中提供縝密的建議，受益良多。

謝謝劉勃佑博士在生物資訊上極大的幫助，帶領我踏入資料分析的大門，並且手把手的教導我每一個步驟，不吝嗇回答任何孤陋寡聞的問題。

感謝生科 847 的夥伴，謝謝助理炳志投入大量額外的時間幫助我找尋合適的採樣點，謝謝前任助理琦蕙在採樣初期陪著我幾乎每周一次的上山探路，謝謝秀晶、高傑、玉君、湘芸、欣如、博崴、惠名、TAKA 在為期一年多近 20 幾次的野外出差的陪伴，過程中歷經了幾次突發狀況，謝謝你們對我始終如一、不離不棄。

感謝漁科 406 的朋友，芊儀、煦誠、彥志、蒙蒙、軒彤、競紋、祐祐、海璿、晉德，每次參與 lab meeting 都能夠從你們口中獲得在微生物實驗上的建議與注意事項。猶記當時趕著送定序徹夜未歸做實驗的夜晚，謝謝你們包容我不太俐落的手腳，依然邀請我參與實驗室大大小小的活動。

最後，由衷感謝我的家人使我衣食保暖、經濟無虞，無條件的支持我投入碩士班學業，過程中陪我挺過了風風雨雨，成為我轉身即可觸及的最大依靠。

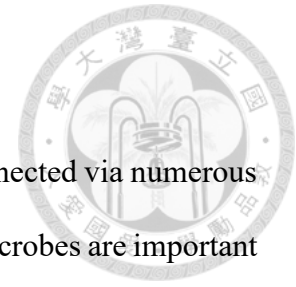
中文摘要



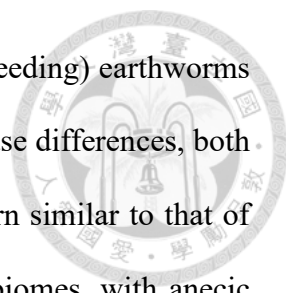
土壤中蘊育著高度的生物多樣性；這個多樣性中的生物藉由營養階層與複雜的土壤食物網彼此相連。其中，動物與微生物在森林生態系中參與凋落物分解與養分循環。地下大型無脊椎動物—蚯蚓，其鑽土行為會改變土壤的物理性質，取食落葉、有機質及微生物可加速凋落物的分解和養分循環，經由腸道排出的糞土亦會改變土壤微生物相。不同生態群的蚯蚓，其食性與鑽土行為不同，對土壤微生物的影響也不同。然而，近年來多數關注蚯蚓對土壤微生物影響的研究，多僅專注在單一物種，且集中在少數養植物種，只有極少數的研究將重心放在野外的蚯蚓群聚。因此，本研究以台灣北部淺山地區四個樣區的蚯蚓群聚為研究對象，探討(1)蚯蚓取食偏好與周界土壤之間；(2)基於穩定同位素劃分生態棲位的蚯蚓類群之間；(3)蚯蚓腸道中不同部位之間的微生物菌相差異。我們以穩定同位素碳 13、氮 15 探討蚯蚓的食性差異，並進一步探討生態群分類，以微生物 16S 核糖體核糖核酸基因結合次世代定序分析蚯蚓腸道土壤與周界土壤微生物菌相。總計採得 13 種蚯蚓， $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 數值越低顯示主要以落葉與表層有機質為食；數值越高則以土壤以及土壤裡的有機質為食。13 個物種可劃分為四個生態群，分屬四個營養棲位，其中傳統上認定的底層型蚯蚓包含兩個營養棲位，推測可能是土壤中棲息深度的變異使得獲取食物資源方式不同。腸道菌相分析的結果與生態群的劃分一致，四個不同的生態群有不同的腸道菌相，並與穩定同位素的結果呈現相同的趨勢。周界土壤與蚯蚓腸道微生物菌相的相對豐富度具有顯著差異。其中，蚯蚓腸道中的優勢菌門為變形菌門、放線菌門、厚壁菌門等。蚯蚓腸道菌相組成顯示相同樣區的蚯蚓個體較相似，而非不同樣區的相同蚯蚓物種，顯示此微生物相地點上的專一性高於宿主物種專一性。

關鍵詞：蚯蚓、功能群、生態群、穩定同位素、次世代定序、微生物菌相

Abstract



Soils harbor an unparalleled biological diversity that is interconnected via numerous trophic links and complex food webs. Among them, soil fauna and microbes are important players in decomposition and nutrient cycling. As ecosystem engineers, earthworms alter biological, chemical, and physical processes and play a vital role in soil functioning. Their borrowing behavior reshapes soil pores and modifies the air permeability and water infiltration; their grazing on leaf litter, soil organic matter, and microorganisms enhance decomposition rate and nutrient cycling; their ingestion of large amounts of material and casting upon the soil surface or in the soil impact microbial community composition and chemical properties. Earthworms of ecological groups have different feeding and burrowing behaviors, and are expected to affect soil microbes differently. However, most studies investigating the interaction between earthworms and microbes are focused on a couple of common, especially vermicomposting, species. Only a few studies looked into earthworm communities in natural habitats. In this study, we sampled earthworm communities in four secondary broadleaf forest sites in northern Taiwan to understand (1) how the microbial communities in the soil selectively ingested by earthworms differ from their surrounding soil habitat, (2) the differences of gut microbiomes between earthworm groups categorized based on their isotopic niches, (3) how microbial communities change after the ingested soils pass earthworm guts. We used carbon and nitrogen stable isotopes to investigate the feeding ecology of different earthworm species and ecological groups. Furthermore, we used next-generation sequencing of the 16S rRNA gene to analyze soil and earthworm gut microbiomes. A total of 13 species of earthworms were collected. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values show that, isotopically, less enriched species represent litter and surface soil feeders, while more enriched are mineral soil feeders. A total of four trophic niches



representing four ecological groups are recognized. Endogeic (soil feeding) earthworms can be divided into two trophic niches, possibly reflecting resource use differences, both spatially and trophically. Earthworm gut microbiomes show a pattern similar to that of stable isotopes: the four ecological groups have distinct gut microbiomes, with anecic species and mesohumic endogeic species occupying the two ends of the spectrum. Bacterial community structures of earthworm gut were distinct from their surrounding soil. Among them, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* were the dominant bacterial phylum in the gut. The gut microbial communities in earthworms showed that the host individuals from the same location are more similar to each other than those of the same species from different locations, indicating earthworms may have regional specificity rather than host species specificity.

Keywords: earthworm, functional group, ecological group, stable isotope, next generation sequencing, microbiome

目 錄



口試委員審定書	i
致謝	ii
中文摘要	iii
Abstract	iv
目 錄	vi
圖目錄	viii
表目錄	x
壹、緒論	1
1.1 土壤生態系	1
1.2 土壤食物網與土壤生物功能群	1
1.3 蚯蚓簡介	2
1.4 蚯蚓生態群與功能	3
1.5 蚯蚓腸道構造	4
1.6 蚯蚓腸道微生物相	4
1.7 微生物作為蚯蚓的食物來源	5
1.9 蚯蚓促進落葉的分解與營養循環	6
1.10 土壤生物食性與營養位階研究工具	8
1.11 應用次世代定序研究蚯蚓與微生物交互作用	9
1.12 研究目的	10
貳、材料與方法	11
2.1 樣區設置	11
2.2 落葉、土壤與蚯蚓採樣	11
2.3 穩定同位素分析、次世代定序分析樣本製備	11
2.3.1 土壤樣本	11
2.3.2 落葉樣本	12
2.3.3 蚯蚓樣本	12
2.4 穩定同位素分析	13

2.4.1 碳、氮穩定同位素	13
2.4.2 穩定同位素資料處理與統計分析	13
2.5 蚯蚓 DNA 條碼分析	14
2.6 蚯蚓腸道與周界土壤微生物菌相	15
2.6.1 去氧核糖核酸萃取、聚合酶連鎖反應與一次切膠純化	15
2.6.2 二次切膠純化與擴增子定序	16
2.6.3 序列資料處理與統計分析	17
參、結果	18
3.1 碳、氮穩定同位素	18
3.2 蚯蚓腸道與周界土壤菌相比較	19
3.3 不同蚯蚓物種間腸道前、後段菌相比較	21
3.4 周界土壤與蚯蚓前、後腸菌相	22
3.5 蚯蚓腸道菌相反映蚯蚓營養位階	23
肆、討論	25
4.1 落葉、土壤、蚯蚓組織的穩定同位素值	25
4.2 周界土壤與蚯蚓腸道土壤菌相組成差異	27
4.3 蚯蚓腸道土壤前、後腸菌相組成	28
4.4 周界土壤與蚯蚓腸道土壤前、後腸菌相組成結構	30
4.5 蚯蚓生態群與其腸道菌相	31
伍、結論	33
陸、參考文獻	35
柒、圖與表	45

圖目錄



圖 1 蚯蚓內部形態構造示意圖	46
圖 2 北部次生林樣區位置	47
圖 3 樣區內標準化採樣示意圖	48
圖 4 用於分析穩定同位素與次世代定序分析之蚯蚓樣本示意圖	49
圖 5 蚯蚓、土壤、落葉之 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 穩定同位素數值	50
圖 6 蚯蚓、土壤、落葉之 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 穩定同位素數值	51
圖 7 合併四個樣區蚯蚓 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 穩定同位素數值	52
圖 8 蚯蚓生態群概念圖	53
圖 9 周界土壤與蚯蚓腸道土壤菌相 ASV 稀釋曲線	54
圖 10 周界土壤菌相 α 多樣性指數分析	55
圖 11 土壤與蚯蚓腸道菌相 α 多樣性指數分析	56
圖 12 蚯蚓腸道土壤與周界土壤之主座標分析 (PCoA).....	57
圖 13 各樣區蚯蚓腸道土壤與周界土壤之主座標分析 (PCoA).....	58
圖 14 蚯蚓腸道土壤與周界土壤優勢菌群菌門(Phylum)階層之相對豐度	59
圖 15 蚯蚓腸道土壤與周界土壤優勢菌群菌綱(Class)階層之相對豐度	60
圖 16 蚯蚓腸道土壤與周界土壤菌相已知最小階層之相對豐度熱點圖	61
圖 17 蚯蚓腸道土壤前、後腸菌相 α 多樣性指數分析	62
圖 18 蚯蚓腸道土壤前、後腸之主座標分析 (PCoA).....	63
圖 19 不同物種蚯蚓腸道土壤前、後腸之主座標分析 (PCoA).....	64
圖 20 各樣區不同物種蚯蚓腸道土壤前、後腸之主座標分析 (PCoA).....	65
圖 21 蚯蚓前、後腸土壤優勢菌群菌門(Phylum)階層之相對豐度	66
圖 22 蚯蚓前、後腸土壤優勢菌群菌綱(Class)階層之相對豐度	67
圖 23 蚯蚓前、後腸土壤菌相已知最小階層之熱點圖	68
圖 24 周界土壤與蚯蚓腸道土壤菌相 ASV 文氏圖	69
圖 25 蚯蚓腸道土壤前、後腸菌相 ASV 文氏圖	70
圖 26 僅存在於蚯蚓腸道土壤菌群已知最小階層之熱點圖	71
圖 27 僅存在於蚯蚓腸道土壤的 ASV 之主座標分析 (PCoA).....	72

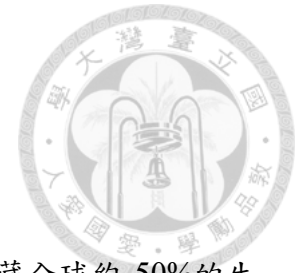
圖 28 周界土壤與蚯蚓腸道土壤前、後腸菌相 ASV 文氏圖	73
圖 29 同時存在於蚯蚓腸道土壤與周界土壤菌群已知最小階層之熱點圖	74
圖 30 同時存在於蚯蚓腸道土壤與周界土壤的 ASV 之主座標分析 (PCoA).....	75
圖 31 不同蚯蚓功能群腸道菌相已知最小階層之主座標分析 (PCoA).....	76

表目錄



表 1 各樣區採集資訊與分析樣本數量	77
表 2 落葉、0-5 cm 土壤、15-20 cm 土壤之 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 平均值及標準差	78
表 3 各物種之蚯蚓 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 平均值及標準差	79
表 4 各樣區之 0-5 cm 土壤、15-20 cm 土壤之 ASV 種數	80
表 5 蚯蚓腸道前、後腸之 ASV 種數	81
表 6 各樣區之周界土壤菌相 α 多樣性指數分析	83
表 7 蚯蚓腸道前、後腸菌相 α 多樣性指數分析	84
表 8 比較樣區之間周界土壤之 α 多樣性指數(one-way ANOVA)	87
表 9 周界土壤 α 多樣性指數在樣區之間兩兩成對比較(Tukey HSD Test)	87
表 10 各樣區內周界土壤與蚯蚓腸道菌相之 α 多樣性指數其中位數差異(Wilcoxon rank sum test)	88
表 11 蚯蚓腸道前、後段菌相之 α 多樣性指數其中位數差異(Wilcoxon signed-rank test)	89
表 12 周界土壤與蚯蚓腸道共享及獨有 ASV 種數與所占的比例	90
表 13 蚯蚓腸道前、後腸菌相獨有的 ASV 種數與所占比例	91
表 14 周界土壤與蚯蚓腸道前、後腸菌相的 ASV 種數	92
表 15 周界土壤與蚯蚓腸道前、後腸菌相的 ASV 比例	93

壹、緒論



1.1 土壤生態系

陸地占全球面積約 30%；在陸域生態系中，土壤生態系蘊藏全球約 50%的生物量(Fierer et al., 2009)。土壤是自然生成，由礦物質、氣體、水、有機物和生物組成的立體結構；土壤為地殼表面一層鬆軟的混合物質，提供植物生長的介質與生物的棲地，調節養分、大氣並淨化水質(Brady et al., 2008)。陸域生態系中能量傳遞有兩個途徑，以土壤表層為界，往上傳至地表食物網、往下傳至土壤食物網；初級生產者所產生的能量僅有少部分被地表上的植食性動物所利用，而大部分的能量以凋落物的形式進入土壤中，成為土壤食物網的基礎能量來源。生物因子及非生物因子皆影響土壤的生態系功能，生物因子包含植物相、動物相與微生物相，以及樹幹、樹枝、花、果實及落葉形成的凋落物(Freschet et al., 2012)；非生物因子包含土壤的 pH 值、溫度、降雨量、母岩性質、地形與風化的時間。居住於土壤中的生物可調節土壤功能，增加落葉和有機質的分解速率、促進元素循環、調節土壤的化學性組成、重組土壤物理性團粒結構、影響地上部植物生長。

1.2 土壤食物網與土壤生物功能群

土壤食物網以原核生物、原生生物、真菌、小型土壤動物(線蟲、線蚓、蟎、跳蟲等)、大型土壤動物(蜈蚣、馬陸、蚯蚓等)所組成，依據食性來源可劃分土壤動物營養階層(Potapov et al., 2022)，包含以植物體為食、啃食葉片或根系的植食者(herbivores)；以植物體凋落物為食(腐木、落葉、有機質)的食碎屑動物(detritivores)；以原核生物、真菌、藻類為食的食微生物者(microbivores)；以捕食其他土壤動物為食的掠食者(predators)。土壤動物營養階層分類下，分解植物體或植物體凋落物者，定義為初級消費者；以初級消費者包括土壤中原核生物、真菌、藻類為食者，定義為次級消費者；以捕食次級消費者為食者，定義為掠食者。若以生物體型大小區分，可分為 micro-food web 和 macro-food web；體型較小的土壤動物中，作為次級消費者者跳蟲會啃食土壤有機質上的初級分解者真菌，而掠食性蟎會以跳蟲為食；體型較

大的土壤動物中，蚯蚓會進食土壤中的初級分解者，而蜈蚣則捕食蚯蚓為食，同時蚯蚓也作為黑冠麻鷺的獵物，土壤食物網進而串連至地上部食物網中。

然而在同一個分類群中，有些土壤動物營養階層分佈廣泛，可依據各個物種的生長策略、形態特徵、微棲地、食物資源、取食方式進而分成不同的生態群或功能群。如線蟲依據其口器形態可推論取食偏好，進而分為植食性、食細菌性、食真菌性、雜食性、掠食性線蟲(Yeates et al., 1993)，並可從碳、氮穩定同位素分析中看到不同食性的線蟲在 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 數值上具有差異(Melody et al., 2016)。跳蟲依據所在微棲地，可分為棲息於植物葉面與枝幹上的 atmobiotic、於落葉層中的 epedaphic、於腐質層及表土層中的 hemiedaphic、以及於深層土壤中的 euedaphic; Li et al. (2020) 將植物以高濃度 ^{13}C 的二氧化碳栽培，提高葉片中 ^{13}C 的含量，並放置不同功能群的跳蟲進行實驗，分析跳蟲 $\delta^{13}\text{C}$ 數值，發現 epedaphic 的物種數值最高、其次為 hemiedaphic、最低為 euedaphic，顯示居住於不同微棲地的跳蟲食性上有一定的差異。其他類群的土壤動物如蟎、白蟻、蚯蚓在分類階層下，也有各自的劃分功能群的依據(Bouché, 1977; Eggleton and Tayasu, 2001; Maraun et al., 2011)。

1.3 蚯蚓簡介

蚯蚓為土壤中常見的大型無脊椎動物，分類上屬於環節動物門(Annelida)中環帶綱(Clitellata)下的厚環帶目(Crassiclitellata)與鍊胃蚓目(Moniligastrida) (Pechenik, 2006)，全球約有 6000 種；蚯蚓的分布範圍，除了沙漠、極地等缺乏土壤覆蓋的地區，陸域生態系普遍都有蚯蚓存在。牠們占據了土壤生物中最大的生物量(Kodama et al., 2014)，並被視為生態系工程師(ecosystem engineer)，一天中可進食比自身重量數十倍重的土壤，大幅改變土壤這個棲地的環境，並影響土壤的物理、化學及生物性質：其鑽土行為重組土壤團粒結構，將表層有機質與底層土壤翻攪均勻，改變透水性及透氣性，影響土壤的物理性質；取食大量的土壤、落葉、有機質及微生物可以加速養分循環及凋落物的分解，影響土壤的化學性質；排出的糞土有利於微生物的傳播，可間接幫助其他土壤生物獲取食物資源並提供微棲地，影響土壤的生物性質(Curry and Schmidt, 2007)。



正蚓科(Lumbricidae)與巨蚓科(Megascolecidae)為蚯蚓中物種數最多、且分布最廣的兩個類群；正蚓科的原生地涵蓋北美洲、歐洲、西亞、中亞、西伯利亞、中國北部、韓國與日本，而巨蚓科分布於北美洲西部、東亞、南亞、東南亞、澳洲與紐西蘭(Chang et al., 2009)。蚯蚓鑑定主要依據外部與內部的形態，並以生殖構造為主；外部特徵包含剛毛的排列、口前葉、背孔、環帶、雄孔、雌孔、乳突等，內部生殖構造包含睪丸、卵巢、受精囊、儲精囊、攝護腺等。蚯蚓為雌雄同體、異體受精，性成熟後形成環帶，交配成功後將卵繭產於土中繁衍後代。根據「台灣物種名錄」(TaiCoL; taibnet.sinica.edu.tw)，台灣已紀錄的蚯蚓有 6 科 16 屬 110 種，包含 78 種原生種；其中厚環帶目(Crassiclitellata)下的巨蚓科(Megascolecidae)有 94 種，為台灣蚯蚓中物種數最多也最常見的科。台灣蚯蚓的分部受到山脈、河川、人為活動影響，在農田及人為干擾較多的平地少有原生種蚯蚓；而在低於海拔 3000 公尺以下的山區為台灣原生種及廣布種所分布的範圍，隨著海拔越高原生種蚯蚓的比例增加(Chang et al., 2009)。河川與山脈的走向形成天然的屏障限制蚯蚓的活動，因此大多數分布於不同山區的原生種蚯蚓彼此之間可能少有基因交流(Chang and Chen, 2005)。Chang et al. (2008)發現在福爾摩沙腔環蚓種群中，不同種或亞種之間呈現明顯的異域分布(allopatric distribution)，受到中央山脈阻隔兩側之間的物種沒有重疊的現象，在北、中、南台灣各地區也各有不同的物種，反映出過去五百萬年來，臺灣造山運動所推動的快速種化。

1.4 蚯蚓生態群與功能

傳統上依據外型、體色、體型大小，將蚯蚓劃分成三種生態群：底層型(endogeic)、表層型(epigeic)、貫穿型(anecic)(Bouché, 1977)。表層型蚯蚓棲息於落葉層中，直接啃食落葉，偏好尚未完全被分解的植物體凋落物，因為棲息於落葉層中此類型蚯蚓體型較小、且體表的色斑較明顯、顏色較深，通常具有較短的生命週期、生長速度快、繁殖率較高；底層型蚯蚓棲息於土層中，挖掘水平孔道且幾乎不爬出土壤表面，以土壤為食，且偏好經由微生物分解較多的有機質，此類型蚯蚓體型中等，且體表的無明顯色斑、顏色較淺(Palm et al., 2013)；貫穿型蚯蚓棲息於較深處的土壤中，挖掘垂直孔道長達數十公分深至底土層，以落葉及表土層中剛腐化的有機質為食，

可以將食物帶往垂直孔道中，此類型蚯蚓體型較大，通常會在土表上孔道周圍排出糞土，糞土的外觀巨大且容易觀察(Perel, 1977)。



1.5 蚯蚓腸道構造

消化道是蚯蚓體內最明顯的構造，可分為口(mouth)、咽(pharynx)、食道(esophagus)、嗉囊(corp)、砂囊(gizzard)、腸道(intestine)、肛門(anus)(圖 1)，蚯蚓取食土壤中的植物碎片、細菌、真菌、原生生物、土壤，經由消化道分解後吸收營養物質，而後由肛門排出糞土；整個過程大約為 8-24 小時，取決於各個物種及體型大小(Wüst et al., 2011)。消化道外圍的肌肉可以調控消化道腔室的大小，協助翻攪食物；消化腺分泌至咽部生成各種不同的消化酵素而混合成黏液(Merino-Trigo et al., 1999)，同時消化道黏液可以協助運輸較粗糙的食物，黏液作為水解酵素及活化蚯蚓腸道的發酵作用；Parle (1963)提出在蚯蚓腸道中含有分解幾丁質與纖維素的消化酶，主要是由蚯蚓自身分泌而來的，僅有少數由腸道微生物所提供。

1.6 蚯蚓腸道微生物相

蚯蚓從環境中所攝取的土壤相對較乾燥、缺乏營養且 pH 值變動幅度較大(pH 4.6-7.1)；蚯蚓腸道相對較濕潤、含水量高達 90%、營養富集、pH 值介於 6.4-7.7(Drake and Horn, 2007)。蚯蚓的腸道為消化道中最大的器官，可分為前腸(foregut)、中腸(midgut)、後腸(hindgut)(圖 1)；含水量、有機物質在前腸最高，向後遞減，腸道菌群在此行發酵作用；N₂O 濃度在前腸最低，向後遞增(Wüst et al., 2009)。早期的研究認為蚯蚓腸道中沒有獨有的菌群：Bassalik (1913)從正蚓科的 *Lumbricus terrestris* 腸道分離出 50 株菌，這些菌株皆出現於周界土壤中，且並非所有土壤中的微生物都能在腸道中存活；Aichberger (1914)利用顯微鏡觀察出現於蚯蚓消化道中的微生物，依序檢視消化道中嗉囊、砂囊、腸道微生物相，並發現能夠存活下來的微生物皆具有強健的細胞壁，而矽藻、鼓藻目、藍綠菌、根足類、酵母菌等土壤中常見的微生物，則無法在蚯蚓腸道中存活下來。與蚯蚓所在的周界土壤相比，腸道的細菌數量較低，而真菌數量則無差異；雖然真菌的菌絲會在蚯蚓的消化道中分解，然而



真菌的孢子具有厚實的外壁，能夠抵禦腸道中的消化酵素而不受影響(Dawson, 1948a)。屬於孢子生成菌的芽孢桿菌屬(*Bacillus*)也發現出現於蚯蚓腸道中，且比例很高(Dawson, 1948b)。不同蚯蚓物種能夠促進特定菌群增長，Kozlovskaya and Zhdannikova (1961)發現底層型蚯蚓 *Octolasion lacteum* 腸道與周界土壤菌相組成相似，但蚯蚓腸道內含有較高比例的孢子生成菌與放線菌，能抵禦惡劣的環境；而表層型蚯蚓 *Lumbricus rubellus* 其腸道菌相的相對豐度高於周界土壤數十倍，因為表層土壤、落葉層的食物資源較豐富；而後的研究顯示 *L. rubellus* 腸道同時含有較高比例梭菌屬(*Clostridium*)中參與丁酸生成的菌群，以及具有纖維素分解能力的菌群(Edwards and Lofty, 1972)。蚯蚓的腸道中具有特殊的環境條件，黏液富含水溶性有機質作為細菌的營養來源，使得特定功能的菌群增長明顯(Barois and Lavelle, 1986)。

1.7 微生物作為蚯蚓的食物來源

有越來越多的研究顯示除了植物的凋落物與土壤中的有機質以外，微生物也是蚯蚓重要的食物來源。Larsen et al. (2016)利用 ^{13}C 穩定同位素標記蚯蚓體內的必需氨基酸(essential amino acid, EAA)，追溯其所吸收的營養分別源自真菌、細菌與落葉所占的比例；貫穿型蚯蚓中 EAA 組成約 60-75 %源自於植物，18-23 %來自細菌；而底層型蚯蚓中 EAA 組成約 50 %源自於植物，50 %來自細菌。此外，在養殖的過程中，發現蚯蚓在單一物種的微生物培養基下無法生存，需要同時合併不同物種或不同類群的微生物才能滿足蚯蚓生存的需求；此結果符合 Miles (1963)在實驗中的發現：微生物的多樣性越高，蚯蚓生長越好。Miles (1963)以 *Eisenia fetida* 作為實驗蚯蚓，發現僅添加真菌及細菌的土壤組別中，蚯蚓達到性成熟比例低，而同時在土壤加入真菌、細菌及原生生物，達到性成熟的比例增加。然而，特定菌群亦導致蚯蚓死亡；*Flavobacterium lutescens*、*Pseudomonas fluorescens* 與 *Streptomyces* spp. 會產生對蚯蚓有害的毒素(Cooke, 1983)。

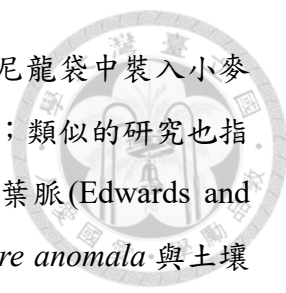
1.8 蚯蚓糞土微生物相

Edwards and Fletcher (1988)指出蚯蚓腸道、糞土、挖掘的通道會使特定微生物族群增加、促進土壤功能。Bhatnagar (1975)研究在草原中的貫穿型蚯蚓所挖掘的通道周圍菌相，其中 42% 菌群為土壤中常出現的厭氧菌，可行固氮作用，16% 行反硝化作用，蚯蚓所挖掘的通道中的細菌行固氮作用、硝化作用、反硝化作用、蛋白質水解的比例遠高於環境中的土壤。Brown et al. (2000)提出蚯蚓取食土壤的過程中，可傳播根系周圍的土壤微生物，活化此類型的微生物有益於植物生長 (plant-beneficial microbes)，促進土壤中氮循環。

蚯蚓糞土在不同階段會與微生物產生交互作用，進而影響土壤功能，包含蚯蚓消化道中的土壤、蚯蚓剛排出來新鮮的糞土、陳年的蚯蚓糞土及糞土化為土壤的一部分 (Martin and Lavelle, 1992)。在消化道中，土壤有機質經由腸道黏液分解成小分子，提供腸道微生物作為食物來源；蚯蚓排出的糞土增強土壤的團粒結構及提高保水力，因為糞土含有大量黏液及營養物質可以推進真菌菌絲生長，產生多醣膠 (polysaccharide gums)；隨著糞土排放出來的時間累積越久，有機物減少無機物增加，此時糞土內的有機物分解速率低於周界土壤，由於陳年糞土的物理性結構會保護內部，促進土壤團粒結構形成使得土壤有機物分解速率下降，後期微生物組成以生長速度較慢的真菌及休眠期的細菌為主。土壤環境中的氮源、碳源為土壤生物所必需的營養物質，蚯蚓的糞土作為土壤微生物的熱點，提升空間異質性，增加其活動量。

1.9 蚯蚓促進落葉的分解與營養循環

蚯蚓在分解有機物質與協助土壤營養循環扮演重要的角色，他們可以促進土壤表面凋落物的分解，透過進食、粉碎及傳輸這些碎屑到更深層的土壤中。蚯蚓排放糞土至土壤表面、挖掘的通道周圍、土壤內的空間中，並形塑土壤中的大型與微型的團粒結構。糞土比起環境中的土壤更能夠促進土壤微生物的活性，植物體凋零後可以被土壤微生物和土壤動物分解，微生物能夠快速地分解部分植物的凋落物與動物的殘骸，然而結構較完整、較難分解的部位如植物體的枝幹、落葉、根系，需要透過較大型的土壤無脊椎動物初步分解，將其粉碎或透過土壤動物消化道中的特定酵素分解，以利於微生物直接利用，蚯蚓在這個階段具有重要的功能。Curry



and Byrne (1992)研究土壤動物的分解效率，將不同孔徑大小的尼龍袋中裝入小麥葉及小麥梗，能夠使蚯蚓進出的組別中分解程度提升了 26-47%；類似的研究也指出蚯蚓除了能夠分解葉身中較柔軟的構造，也能分解葉梗及葉脈(Edwards and Heath, 1963)，Martin (1991)發現分布於熱帶地區的蚯蚓 *Metaphire anomala* 與土壤相比其糞土中含有大型粗糙碎屑比例較低，表示通過蚯蚓的腸道消化而排出來的糞土有機質的分解程度較高，形成更細小的碎塊。Parmelee et al. (1990) 研究指出利用殺蟲劑與農藥除去 90%蚯蚓個體，可提升 43%土壤細根、30%粗根及 32%有機物生物量，顯示蚯蚓數量與有機質分解的速率與呈現正相關；然而，若將森林中的蚯蚓移除後，會降低有機質的分解速率、減少土層翻攪程度，沒有蚯蚓的土壤中通常會有明顯的土層分界，包含尚未分解的落葉層、在土壤表面被初步分解的有機層、礦物質含量隨之增高的表土層到底土層(Langmaid, 1964)。

蚯蚓能夠轉化大量的土壤有機質，然而蚯蚓排放出的二氧化碳僅占整體陸域生態系土壤呼吸的 5-6%，原因在於蚯蚓同化土壤中的碳源效率低，底層型蚯蚓碳源轉換效率約為 2-18%，而表層型約為 43-55%(Dickschen and Topp, 1987)。蚯蚓對於土壤中碳儲存量的影響，至今仍然為待解之謎。有學者認為蚯蚓會降低土壤中碳儲存量，由於蚯蚓的翻土行為會促進土壤有機質的礦化作用；O'brien and Stout (1978)在紐西蘭的牧場中引進了蚯蚓後，估計每年碳源的流通量增加了 300-1000 kg/ha，有機碳停留在土壤的時間從平均為 180 年降低至 67 年，Lubbers et al. (2013)回顧 1990 至 2011 年文獻中有關於蚯蚓對於土壤碳儲存量的研究，進行整合分析，發現蚯蚓出現的地區導致溫室氣體的排放增加，使得 CO₂ 排放量提高 33%，N₂O 排放量提高 42%。相反的，也有研究認為蚯蚓的活動能夠促進周遭植物生長，蚯蚓的糞土能使土壤有機質更穩定，長期而言能夠提升土壤中碳儲存量，並減少土壤有機質的礦化作用(Edwards, 1997; Lavelle and Spain, 2002)。Knowles et al. (2016)指出底層型蚯蚓可以重組碳源的分布，在養殖 *Aporrectodea tuberculata* 這種蚯蚓的組別中，比起沒有蚯蚓的環境下，可提升 67%土壤中大型團粒結構，隨著團粒結構增加，土壤中的碳儲存量增加 60%。

陸域生態系中氮源做為生物體組成的重要元素之一，從植物體中有 3-17%氮源轉化至蚯蚓的組織(Nowak, 1975)，大多數的氮源在蚯蚓組織中與蛋白質組成有關，蛋白質含量占了蚯蚓身體中的 60-80%(Sabine, 1978; Bouché, 1981)。在體蚯蚓

內所同化的氮會隨著糞土排放至土壤中；Bouché and Ferriere (1985)將貫穿型蚯蚓 *Nicodrilus longus* 餵食 ^{15}N 及 ^{13}C 標記後之藻類作為食物來源，發現在蚯蚓整體碳、氮的轉化效率約為 40 天，新鮮的糞土亦可以促進反硝化作用(Svensson et al., 1986; Elliott et al., 1990)

1.10 土壤生物食性與營養位階研究工具

早期研究土壤動物食性的主要方式，是透過野外、實驗室內直接觀察取食行為、解剖胃內含物檢視食物碎屑、以顯微鏡觀察口器形態特徵來推測土壤動物吃進去的食物資源；然而，上述方法對於體型較小或以口器吸食的土壤動物有所限制。在 1970-1980 年，隨著分子與生化技術的進步，能更精準的推測土壤生物的食性分析。包含利用 sanger sequencing 分析土壤動物的胃內含物，設計特定引子放大目標基因，鑑定其所攝入的食物；然而，此方法無法量化進食的總量與比例，且設計出對於每個分類群都具有高度專一性的引子的難度較高(Admassu et al., 2006)。針對土壤生物腸道中消化的物質與吸收的營養，可利用消化酵素活性的測定，例如纖維素酶、蛋白酶、去氫酶等(Ravindran et al., 2015)；此方法對於食性廣泛的土壤生物是很好的探測工具，然而僅能間接推測潛在的食物資源，也無法區分消化酵素分泌是來自動物本身，或來自腸道內共生微生物。磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acids, PLFA)是能夠劃分特定微生物類群的生物指標，PLFA 為細胞膜磷脂質的重要組成，可以測定微生物的總量、特定功能菌群的族群結構；然而此工具對於微生物相的分類較粗淺，僅能將微生物劃分為少數幾個特定類群(Enami et al., 2001; Sampedro et al., 2006)。

為了劃分不同的土壤生物營養位階，可利用穩定同位素分析土壤生物與其潛在的食物資源，追溯生物體轉化成自身營養的食物來源。地球上常見的同位素有碳、氫、氧、氮、硫等，其中 ^{13}C 與 ^{15}N 最常用於分析土壤食物網，以取食來源可劃分不同功能群的土壤生物，如：線蟲、蟎、蚯蚓，其碳、氮穩定同位素數值結果可以區分土壤生物食性差異，以新鮮植物為食者、以凋落物為食者、以微生物為食者、掠食者其 ^{13}C 與 ^{15}N 可以劃分為不同營養階層(Maraun et al., 2011; Chang et al., 2016; Melody et al., 2016)。碳在土壤生態系中含量豐富，與其食物資源息息相關，氮為

組成動物肌肉組織重要的來源，生物體中 $\delta^{13}\text{C}$ 數值會接近於進食的食物資源 (DeNiro and Epstein, 1978)，而 $\delta^{15}\text{N}$ 數值則與其食物資源約略相差 $3.4 \pm 1.1\%$ (Minagawa and Wada, 1984)。棲地環境的植被組成與有機質被微生物分解的程度皆會影響基礎食物資源穩定同位素數值，進而影響土壤生物，利用此工具能夠量化土壤生物營養位階。而在土壤動物腸道菌相的分析中，次世代定序能將菌群結構以更高的解析度劃分，提供更明確的資訊，以瞭解不同食性的土壤動物腸道菌相的變動。這些技術可協助我們克服許多前人研究的限制，透過不同的證據更清楚土壤動物的營養位階、對於土壤生態系的功能、與其他土壤生物之間的交互作用，增進我們對土壤食物網的瞭解。

1.11 應用次世代定序研究蚯蚓與微生物交互作用

利用次世代定序分析細菌 16S rRNA 能提供高通量且詳細的細菌分類群資訊，使我們更深入的了解菌群的變動。近年來應用於蚯蚓的研究越來越普遍；許多學者以蚯蚓腸道、糞土進行菌相分析 (Aira et al., 2019; Aira et al., 2022)，而大多數研究著重於蚯蚓暴露在環境重金屬下的反應 (Pass et al., 2015; Wang et al., 2019; Brantschen et al., 2020; Huang et al., 2021)、蚯蚓降解農藥 (Krishnaswamy et al., 2021; Zhu et al., 2021; De Bernardi et al., 2022)、殺菌劑 (Ma et al., 2017)、抗生素 (Huang et al., 2021)、廢棄汙泥 (Huang et al., 2022) 的程度，在人為操控在不同極端條件下，探討蚯蚓如何代謝環境有毒元素；其中，部分研究將野外採集的個體進行蚯蚓堆肥，以動物的糞便 (Hu et al., 2020; Wang et al., 2021)、廚餘作為底材或在農田中飼養 (Schlatter et al., 2019; Li et al., 2021)。

然而，上述研究多在人工飼養環境下進行，且多侷限於單一常見蚯蚓物種 (例如堆肥常用的蚯蚓 *Eisenia fetida*)，無法反映出蚯蚓在野外的真實情況。Sapkota et al. (2020) 於丹麥草原地區採集五種蚯蚓共含有兩個生態群，指出不同生態群蚯蚓其腸道微生物相組成具有差異，且不同物種的蚯蚓腸道微生物相有物種特異性 (species specific)。到目前為止，針對森林、草原等野外環境中蚯蚓群聚的研究僅有寥寥數篇 (Price-Christenson et al., 2020; Sapkota et al., 2020; Wang et al., 2021)，亦僅有少數研究利用次世代定序探討蚯蚓對土壤微生物相的影響 (Liu et al., 2018; Aira et

al., 2019; Bray et al., 2019; Schlatter et al., 2019; Brantschen et al., 2020; Hu et al., 2020; Aira et al., 2022)。若能納入更多不同的蚯蚓物種同時為森林中野外採集的蚯蚓，可以補足現階段我們對蚯蚓如何影響微生物群聚的知識。



1.12 研究目的

蚯蚓作為土壤食物網中的大型碎食者，天敵僅有少數體型較大的肉食性動物如蜈蚣、擬步行蟲、鼯鼠、鳥類等。在土壤食物網中，蚯蚓就像是海洋生態系中的鯨魚，以大量的基礎食物資源為食，能量卻沒有傳至更高的消費者中，形成了營養能階的天花板，這個特點可以使我們能夠推測陸域生態系中主要能量傳遞的方向，也夠容易比較蚯蚓物種之間的營養階層的差異。然而，多數研究僅針對容易於實驗室中養殖的蚯蚓物種例如 *L. terrestris*、*E. fetida*，對於野外共域的蚯蚓彼此之間營養位階與食性差異了解甚少；且幾乎集中在北半球溫帶地區常見的正蚓科，至於物種數最多、全球分布範圍最廣的巨蚓科，相關研究則付之闕如。

因此本研究在北台灣次生林地區進行野外探勘，針對具有三種以上蚯蚓的地點劃設樣區，進行標準化採樣，並依野外觀察與形態(取食習性、行為、棲息土壤深度、體色、體型大小等)將蚯蚓劃分為表層型、底層型、貫穿型三個生態群(Bouché, 1977)，利用兩種方法研究不同群聚組成下蚯蚓的營養位階與食性差異。其一為以碳、氮穩定同位素分析蚯蚓肌肉組織與所在棲地落葉、土壤，探討(1)不同物種與不同生態群之間的取食偏好；(2)透過各物種的同位素棲位的範圍與數值，劃定蚯蚓的營養階層。其二為利用次世代定序分析周界土壤與蚯蚓腸道菌相，以比較(3)蚯蚓所在的周界土壤與蚯蚓腸道土壤之間的差異；(4)蚯蚓挑選進食後的食物，消化過程中在蚯蚓腸道中不同區段的菌相的變化；(5)不同物種或不同生態群腸道菌相組成差異。

貳、材料與方法



2.1 樣區設置

本研究於北台灣低海拔次生林沿既有步道探勘選取四個樣區，分別位於基隆市中山、台北市內湖、新北市雙溪、新北市新店。樣區選擇排除草地、灌叢、人造林與竹林，並需有三種以上、初步依形態判定至少兩個功能群的蚯蚓。每個樣區為邊長三公尺的正方形，總面積為九平方公尺，樣區內再切割為九個邊長一公尺的正方形樣框。採樣時間介於 2020 年 9 月與 2021 年 12 月之間。

2.2 落葉、土壤與蚯蚓採樣

以五點取樣法(five point sampling method)在樣區中心與對角線共五個一平方公尺的正方形樣框中設置落葉框，落葉框大小為邊長 50 cm 的正方形，蒐集落葉框內土表上的落葉。而後，分別在各個一平方公尺的正方形樣框內取一個深度 20 cm 的土柱，共計九個土柱；從每個土柱($\varnothing=2$ cm)中分離出表層土壤(0-5 cm)與底層土壤(15-20 cm)。在完成落葉與土壤採樣後，挖取樣區內所有蚯蚓(圖 3)；首先利用電蚯蚓機產生的電流將蚯蚓逼出土表，再以小鋤頭挖掘深度約 0-20 cm 的土壤，挖取樣區內殘餘的蚯蚓；總計於四個樣區取得 13 種蚯蚓與 150 隻個體(圖 2；表 1)。

2.3 穩定同位素分析、次世代定序分析樣本製備

2.3.1 土壤樣本

採集的樣本會在 24 小時內進行後處理。共計於四個採樣區中取得 72 個土壤樣本，包括 36 個表層土壤、36 個底層土壤。在每個樣區中，全部九個樣框共 18 個土壤樣本皆用於穩定同位素分析；採集於中央與四個角落共計五個樣框的 10 個土壤樣本則會進一步做微生物分析，總計共 40 個土壤樣本包括 20 個表層土壤、20 個底層土壤額外取出次樣本進行微生物分析。土壤樣本過篩(2 mm 篩網)使其均質並排除土壤中的碎石及植物的根；過篩完的土壤樣本額外取出次樣本 0.25g 保存

於 -20°C 作為後續微生物分析使用；其餘放置烘箱(60°C)，烘乾 48-72 小時後將土壤樣本磨成粉。穩定同位素分析之土壤樣本取 38.000-42.000 mg 裝入錫囊中，包裹成錠狀放置於 96 孔盤並保存於防潮箱。



2.3.2 落葉樣本

四個採樣區內共計取得 20 個落葉樣本，僅以穩定同位素分析。落葉樣本放置於烘箱(60°C)，烘乾 48-72 小時後壓碎過篩(4 mm 篩網)使其均質，並排除落葉中的碎石及枯枝，過篩完的落葉再將其磨成粉。穩定同位素分析之落葉樣本取 3.8000-4.200 mg 裝入錫囊中，包裹成錠狀放置於 96 孔盤並保存於防潮箱。

2.3.3 蚯蚓樣本

四個採樣區內共計取得 13 種蚯蚓共 150 隻個體；150 隻個體皆製備於穩定同位素分析，額外選取各樣區樣本數達 4 隻以上的蚯蚓物種，共計 9 種 50 隻個體(表 1)，解剖取其腸道土壤進行微生物分析。採得的蚯蚓在採樣當日於立體顯微鏡下進行活體鑑定。物種鑑定依據台灣蚯蚓誌(Chang et al., 2009)，經由篩選出已成熟具有環帶或未成熟已具有雄孔構造的蚯蚓，根據其外部形態包含環帶位置、剛毛的排列、雄孔特徵、受精囊孔數量與乳突等鑑定蚯蚓物種。許多土壤動物在不同生命階段會轉換食性(Schmidt, 1999; Potapov et al., 2014; Wilschut et al., 2019)，為了避免樣本之間受到穩定同位素分化作用的影響，僅選用成熟具有環帶的個體，且排除蚯蚓體內其他部分的構造，僅留下肌肉組織作分析。台灣蚯蚓誌未涵蓋的物種則以暫定的形態種區分。初步鑑定後的蚯蚓保存於 -20°C 。

蚯蚓取其肌肉組織作為穩定同位素分析；取其前、後腸道內土壤做微生物分析(圖 4)，前腸視為蚯蚓經由選擇所進食的土壤；後腸視為經由蚯蚓體內消化道分解過後即將排出的糞土。以二次蒸餾水洗去蚯蚓體表土壤，環帶後端為起始點至尾端將蚯蚓平均劃分為三個區段，依序定義為前腸、中腸、後腸。解剖後僅取其前、後腸道內土壤置於離心管中，保存於 -20°C 作為微生物分析使用。蚯蚓頭部與前腸區段放置於 95%酒精中保存，後續並依前述形態鑑定特徵與方法進行二次物種確

認。中腸、後腸區段在清除血管、神經、腸道等器官之後，留下蚯蚓體壁肌肉組織，放置於冷凍乾燥 3-5 天，再以 Mini-Beadbeater-16 微珠研磨機(Model 607; BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA)將組織磨成粉狀。穩定同位素分析之蚯蚓體壁肌肉組織取 0.900-1.100 mg 裝入錫囊中，包裹成錠狀放置於 96 孔盤並保存於防潮箱。

2.4 穩定同位素分析

2.4.1 碳、氮穩定同位素

土壤、落葉、蚯蚓組織皆送至 University of California Davis Stable Isotope Facility (Davis, California, USA)進行碳、氮穩定同位素分析。蚯蚓與落葉樣本以 PDZ Europa ANCA GSL 元素分析儀燃燒後串聯 PDZ Europa 20-20 同位素比值質譜儀 (Sercon, Cheshire, UK)；土壤樣本以 Elementar Vario EL Cube 或 Micro Cube 元素分析儀 (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany)串聯 Isoprime VisION IRMS (Elementar, Cheshire, UK)或串聯 PDZ Europa 20-20 同位素比值質譜儀 (Sercon, Cheshire, UK)進行分析。

$\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 計算公式：

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{sample}} \text{ 或 } \delta^{15}\text{N}_{\text{sample}} = [R_{\text{sample}} / R_{\text{standard}} - 1] \times 1000\text{‰}$$

穩定同位素數值以 delta (δ)表示，R 值為 $^{13}\text{C} : ^{12}\text{C}$ 或 $^{15}\text{N} : ^{14}\text{N}$ ，分別為樣本 (sample)及標準品(standard)的比值，單位為千分比(‰)，碳、氮國際標準品分別為 VPDB(Vienna Pee Dee Belemnite)與大氣中的氮氣。

2.4.2 穩定同位素資料處理與統計分析

穩定同位素所有原始資料都在 R v4.1.3 平台進行分析與製(R.Core.Team, 2022)圖，並以 ggplot2 套件(Wickham, 2016)繪圖。將 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 原始數值依據地區分別繪製，並將相同物種樣本數達四個以上繪製橢圓，取其範圍 70%信賴區間作為橢圓範圍(Fox and Weisberg, 2011)，為了比較各採樣地之間蚯蚓的營養位階，將蚯蚓 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 以落葉或 0-5 cm 表土做校正。

2.5 蚯蚓 DNA 條碼分析



活體與酒精標本鑑定所得之蚯蚓物種與形態種中，若對鑑定結果存疑，則以 DNA 條碼 (DNA barcodes) 進一步確認。從 95%酒精保存之蚯蚓樣本上剪取約 5 mg 的組織 以 FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini-Kit (Favorgen, Ping-Tung, Taiwan) 萃取 DNA。萃取出的 DNA 以超微量分光光度計(NanoDrop™ Lite Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA)紀錄濃度及純度。蚯蚓物種鑑定使用常用在動物物種鑑定的 DNA 條碼，也就是粒線體細胞色素 c 氧化酶次單元 1 (cytochrome *c* oxidase subunit 1, COI)(Hebert et al., 2003)，PCR 使用的引子對為 LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') 與 HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') (Folmer et al., 1994)，序列增幅長度為 658 bp。PCR 反應總體積為 20μL，內含有 LCO1490 / HCO2198 引子 0.5μL (10μM)、0.1U Taq DNA polymerase (5U/uL) (SuperTherm Taq, JMR-801, JMR-Holdings, UK)、2μL Ex Taq buffer (10×)、1.6μL dNTP mixture (2.5mM)、2μL of 12.8mg/mL BSA 以及萃取之 DNA 模板 1μL (150-300ng)，並補滅菌 ddH₂O 至總體為 20μL。

PCR 混合液放置於溫度循環器 (Biometra TOne Thermal Cycler, Analytik Jena GmbH, Jena, Germany)，儀器設定參數為(1)preheating: 94 °C-1 分鐘；(2)denaturation: 94 °C-30 秒，annealing: 45°C-30 秒，extension: 72 °C-50 秒，以上共 6 個循環；(3)denaturation: 94 °C-30 秒，annealing: 54°C-30 秒，extension: 72 °C-50 秒，以上共 35 個循環；(4)final extension: 72 °C-10 分鐘。PCR 產物進行瓊脂膠體電泳 (1.5% agarose gel electrophoresis)，在藍光下確認增幅成功。

增幅的產物與 PCR 引子送至基隆米克斯公司(台北，台灣)進行定序，以 ABI 3730X Genetic Analyzer (Applied Biosystem, US)分析產物，定序結果利用 Geneious 軟體 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) 將序列組合，再以 CLUSTALX(Thompson et al., 1997)將序列對齊，並比對實驗室內部台灣蚯蚓的 DNA 條碼資料庫鑑定物種。

2.6 蚯蚓腸道與周界土壤微生物菌相

2.6.1 去氧核糖核酸萃取、聚合酶連鎖反應與一次切膠純化



總計有 140 個樣本進行微生物分析，包含 40 個土壤樣本、50 個蚯蚓前腸樣本、50 個蚯蚓後腸樣本，萃取 DNA 使用 DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Germany)，萃取之 DNA 以超微量分光光度計(NanoDrop™ Lite Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA)紀錄濃度及純度，並保存於-20 °C 作為後續實驗使用。

16S 核糖體核糖核酸(16S ribosomal RNA)為原核生物核糖體次單元組成，16S rRNA 序列包含保守區及九個高度變異區，利用變異區的獨特性可作為細菌鑑定物種之依據，選用 16S rRNA 高度變異區 V6-V8，通用引子對 968F(5'-AAC GCG AAG AAC AAC CTTAC-3')及 1319R(5'-ACG GGC GGT GWG TRC-3') (Yarza et al., 2014)，序列增幅長度約為 424 bp。PCR 反應總體積為 40μL，內含有 968F / 1319R 引子對 0.8μL (10μM)、0.24μL Taq DNA polymerase (5UμL⁻¹)(Takara Bio, Otsu, Japan)、4μL Ex Taq buffer (10×)、3.2μL dNTP mixture (2.5mM)、以及萃取之 DNA 模板 1μL (50-100ng)，並補滅菌 ddH₂O 至總體為 40μL。

PCR 混合液放置於溫度循環器 (MiniAmp™ Thermal Cycler, Thermo Scientific, USA)，儀器設定參數為(1)preheating：94 °C-5 分鐘；(2)denaturation：94 °C-30 秒，annealing：52°C-20 秒，extension：72 °C-45 秒，共 30 個循環；(3)final extension：72 °C-10 分鐘。PCR 產物進行瓊脂膠體電泳(2.0 % agarose gel electrophoresis)，在藍光下確認增幅成功並切下目標片段於 424 bp，將切下的膠體進行純化，使用 QIAEX II agarose gel extraction kit (Qiagen, Germany)純化 DNA 擴增子(DNA amplicon)，純化之 DNA 擴增子以超微量分光光度計(NanoDrop™ Lite Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA)紀錄濃度及純度。

DNA tagging PCR (DT-PCR)為將 DNA 擴增子黏合不同組合的標記(tag)，以利定序後辨認不同樣本。根據 Chen et al. (2011)，分別針對引子對 968F 和 1319R 的 5'端額外設計四個 bp(由 A、T、C、G 排列組合)，共可得 256 組排列組合，而在此使用了其中 37 組標記引子對。

將每個樣本的 DNA 擴增子搭配標記引子對進行 DT-PCR，反應總體積為 50 μL ，內含有 2.0 μL 標記引子對 968F/1319R (10 μM)、0.5 μL Taq DNA polymerase (5U mL^{-1})(Takara Bio, Otsu, Japan)、5 μL Ex Taq buffer (10 $\times$)、4.0 μL dNTP mixture (2.5mM)、以及 DNA 模板 10 μL (10-50ng)，並補滅菌 ddH₂O 至總體為 50 μL 。

2.6.2 二次切膠純化與擴增子定序

DT-PCR 混合液放置於溫度循環器 (MiniAmp™ Thermal Cycler, Thermo Scientific, USA)，儀器設定參數為(1)preheating：94 °C-3 分鐘；(2)denaturation：94 °C-30 秒，annealing：52°C-20 秒，extension：72 °C-45 秒，共 5 個循環；(3)final extension：72 °C-10 分鐘。

為了確認 DT-PCR 產物是否有標記成功，將已標記的 DT-PCR 產物與未標記 DNA 擴增子同時進行瓊脂膠體電泳(2.0 % agarose gel electrophoresis)，以藍光儀檢視，由於已標記之 DT-PCR 產物大約為 432 bp，在瓊脂膠體比較兩者亮帶顯示亮度較亮者及亮帶位置高於未標記之 DNA 擴增子，則表示 DT-PCR 產物標記成功。

增幅成功樣本切下目標片段於 432 bp，將切下的膠體進行純化，使用 QIAEX II agarose gel extraction kit 純化 DNA 擴增子，純化之 DNA 擴增子同時以超微量分光光度計(NanoDrop™ Lite Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA)及螢光分光光譜儀(Invitrogen™ Qubit™ 3 Fluorometer)紀錄濃度及純度。

純化且已標記的 DNA 擴增子以每個樣本取濃度 100 ng 合併至 1.5 mL 離心管(每 32-36 個樣本為一管)，再利用 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) 將合併樣本濃縮純化成最終產物，以超微量分光光度計(NanoDrop™ Lite Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA)及螢光分光光譜儀(Invitrogen™ Qubit™ 3 Fluorometer)紀錄濃度及純度，最終產物的濃度介於 2000-3000ng，A260/A280 介於 1.8-2.0。

樣本定序送至有勁基因公司(Taipei, Taiwan)，使用 Illumina 定序平台(Miseq® PE300)進行次世代定序 paired-end 技術(next generation sequencing)，定序長度為 2 $\times$ 300 bp。

2.6.3 序列資料處理與統計分析

將原始序列在 QIIME2 v2019.10 平台彙整，使用 DADA2 v1.6 將序列進行前處理(Callahan et al., 2016)，序列經由去除引子、序列過濾、組裝、移除嵌合體(chimera)，留下來的序列為高解析度的擴增序列變體(amplicon sequencing variants, ASVs)，接著以 VSEARCH 將 ASVs 與資料庫(SILVA v99)進行比對並分類命名(Rognes et al., 2016)，剔除分類階層下屬於古菌(archaea)、葉綠體(chloroplast)、粒線體(mitochondria)及未分類(unclassified)的 ASV，匯入 R v4.1.3 平台(R.Core.Team, 2022)進行後續分析與製圖(Phyloseq, ggplot2 packages) (McMurdie and Holmes, 2013; Wickham, 2016)

稀釋曲線以最小的定序深度將所有樣本統一，標準化所有樣本的定序深度作為計算 α 多樣性指數，分別計算樣本中 ASV 的物種豐富度與物種多樣性，分別為 ASV 物種豐富度 (ASV 種數)及 Shannon 物種多樣性指數，Shapiro–Wilk test 檢視樣本是否符合常態分布，符合常態分布者經 Levene's test 確認變異數是否具有同質性，具有同質性以 ANOVA 比較平均值的變異，並以 Tukey's test 進行後驗；不符合常態分布者，兩兩比較的樣本以 Wilcoxon signed-rank test、兩組以上的樣本以 Kruskal-Wallis test 比較中位數的變異，並以 Dunn's test 進行後驗，找出個別有差異的組別。樣本之間菌相物種組成差異，分別比較不同地區、不同此土壤樣本類型(周界土壤、腸道土壤)、不同蚯蚓腸道區段(腸道前、後腸)、不同物種，基於 Bray-Curtis 計算樣本距離矩陣以 PCoA 分析，以 ANOSIM 比較組間差異是否大於組內差異，並藉由相對豐度以不同的分類層級，檢視組間之間菌群的組成。

參、結果



3.1 碳、氮穩定同位素

穩定同位素碳 13、氮 15 平均值隨著土壤深度越深數值越高， $\delta^{13}\text{C}$ 在落葉的範圍從 -32.23 ‰ (SD = 0.24) 到 -30.12 ‰ (SD = 0.33)；0-5 cm 土壤為 -28.50 ‰ (SD = 1.13) 到 -26.23 ‰ (SD = 1.15)；15-20 cm 土壤為 -25.60 ‰ (SD = 1.82) 到 -21.14 ‰ (SD = 1.14)， $\delta^{15}\text{N}$ 在落葉的範圍從 -2.72 ‰ (SD = 0.26) 到 -0.42 ‰ (SD = 0.18)；0-5 cm 土壤為 1.80 ‰ (SD = 0.87) 到 4.13 ‰ (SD = 0.51)；15-20 cm 土壤為 4.12 ‰ (SD = 1.20) 到 6.52 ‰ (SD = 0.44) (表 2)，各地區 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 數值由低至高依序為落葉、0-5 cm 土壤、15-20 cm 土壤(圖 5)。

總計採集到的 13 種蚯蚓在依據體色、體型大小、野外觀察，將其生態群劃分為表層型蚯蚓(epigeic)：*Amyntas corticis*、*Amyntas tayalis*、sp14 (*Amyntas*)；底層型蚯蚓(endogeic)：*Amyntas rockefelleri*、*Amyntas incongruus*、*Amyntas minimus*、*Drawida* sp02、*Metaphire californica*、sp18 (*Amyntas*)、sp41 (*Amyntas*)；貫穿型蚯蚓(anecic)：*Amyntas lini*、*Metaphire trutina*、*Metaphire yuhsi*。

蚯蚓的肌肉組織中， $\delta^{13}\text{C}$ 平均值最低者為內湖 *M. trutina*，其數值為 -28.31 ‰ (SD = 0.23)；最高為基隆 *A. minimus*，其數值為 -25.87 ‰ (SD = 0.97)。 $\delta^{15}\text{N}$ 平均值最低為新店 *M. trutina*，其數值為 -0.98 ‰ (SD = 1.05)；最高為基隆 *A. rockefelleri* 其數值為 6.01 ‰ (SD = 0.22) (表 3)。

單就各地區而言，以 $\delta^{13}\text{C}$ 與 $\delta^{15}\text{N}$ 呈現於座標軸線上的範圍表示其同位素棲位(isotopic niche)(圖 6)。新北市雙溪的蚯蚓 $\delta^{13}\text{C}$ 落在 -27.11 ‰ ~ -25.49 ‰、 $\delta^{15}\text{N}$ 落在 1.13 ‰ ~ 5.68 ‰，此地區內所採集的兩種蚯蚓 (*A. rockefelleri* 與 *A. incongruus*) 皆屬於底層型蚯蚓，然而兩者同位素棲位明顯不同；基隆市中山的蚯蚓 $\delta^{13}\text{C}$ 落在 -27.34 ‰ ~ -24.87 ‰、 $\delta^{15}\text{N}$ 落在 1.67 ‰ ~ 6.19 ‰，同時有底層型與表層型蚯蚓，以同位素棲位比較此兩種生態群具有差異，而底層型的蚯蚓在同位素棲位上可更細分成兩群以上 (見下一段)；台北市內湖的蚯蚓 $\delta^{13}\text{C}$ 落在 -28.55 ‰ ~ -26.73 ‰、 $\delta^{15}\text{N}$ 落在 -0.50 ‰ ~ 1.26 ‰，同時有表層型與貫穿型蚯蚓，以同位素棲位比較此兩種生態群相近，表示其所利用的潛在食物資源相同；新北市新店蚯蚓 $\delta^{13}\text{C}$ 落在 -28.74 ‰

~ -25.03 ‰、 $\delta^{15}\text{N}$ 落在 -2.55 ‰ ~ 3.78 ‰，同時有表層型、底層型與貫穿型蚯蚓，因此 $\delta^{13}\text{C}$ 與 $\delta^{15}\text{N}$ 數值範圍最廣，表層型與貫穿型蚯蚓同位素棲位重疊，表示其所利用的潛在食物資源相同，而底層型的蚯蚓在同位素棲位上可更細分成兩群（見下一段）。

綜觀四個地區，將 13 種蚯蚓合併作圖，以原數值(圖 7；A 圖)呈現、以落葉(圖 7；B 圖)、0-5 cm 土壤(圖 7；C 圖)做校正後呈現，依據同位素棲位將 13 種蚯蚓更詳細劃分為四個生態群，Mesohumic endogeic：*A. rockefelleri*、*A. minimus*、*Drawida* sp02、sp41；Polyhumic endogeic：*M. californica*、*A. incongruus*、sp18；Epi-endogeic：*A. corticis*、*A. tayalis*、sp14；Anecic：*A. lini*、*M. trutina*、*M. yuhsi*。原先歸類為底層型蚯蚓可更細分為 Mesohumic endogeic—取食礦物質含量較高且有機質含量較低的土壤，以及 Polyhumic endogeic—取食礦物質含量較低且有機質含量較高的土壤，原先歸類為表層型的蚯蚓由於在樣區所採的個體並非全然棲息於落葉層中，而在此定義為 Epi-endogeic—取食落葉及表土層中的腐植質(圖 8)。

3.2 蚯蚓腸道與周界土壤菌相比較

總定序量經由正、反序列黏合、去除 chimera，共有 7880493 條序列。土壤與蚯蚓腸道共 140 個樣本，ASV 總數位在 14088~87362 之間，中位數為 57209(表 4、表 5)，將 ASV 數量過低的樣本 SIEW0203_A、SIEW0203_P、SIEW0379_A、SIEW0379_A 刪除後，將周界土壤與蚯蚓腸道土壤分別繪製 ASV 稀疏曲線，序列資料統一校正至 26371 條序列(圖 9)，以利後續分析。

以 ASV 階層來看，比較四個採集樣區周界土壤菌相，分析其菌相 α 多樣性，ASV richness 顯示四個採集樣區周界土壤菌相具有顯著差異($p = 0.0089$)(圖 10、表 6、表 8)，在台北市內湖與其他採樣區相比 ASV 種數最低，與其他三個地區具有顯著差異，Shannon 多樣性指數同時納入 ASV 物種豐富度與物種均勻度計算，顯示四個採集樣區周界土壤菌相具有顯著差異($p = 0.00063$)(圖 10、表 6；ANOVA test 如表 8)，新北市新店高於台北市內湖、新北市雙溪，具有顯著差異(Tukey HSD Test 結果如表 9)。

比較四個地區內蚯蚓腸道與所在周界土壤菌相，分析其菌相 α 多樣性，ASV richness 顯示新北市雙溪的土壤高於蚯蚓腸道，具有顯著差異($p = 0.0439$)，其它地區則無顯著差異(圖 11、表 6、表 7；Wilcoxon rank sum test 結果如表 10)，Shannon 多樣性指數顯示台北市內湖與新北市雙溪的周界土壤高於蚯蚓腸道(台北市內湖： $p = 0.000258$ ；新北市雙溪： $p = 0.00135$)，其它地區則無顯著差異(圖 11、表 6、表 7；Wilcoxon rank sum test 結果如表 10)。

綜觀四個地區土壤與蚯蚓腸道菌相物種組成差異，分析其菌相組成差異，基於 Bray-Curtis 相異度分析計算樣本距離矩陣，呈現於主座標分析圖 (Principal Coordinates Analysis, PCoA)(圖 12)，PCoA1 與 PCoA2 分別可以解釋 14 %與 9.3%的變異，單就各地區土壤與蚯蚓腸道菌相物種組成，以 Bray-Curtis distance 計算得到四組之 PCoA(圖 13)，四個地區之 PCoA1 約為 15%~33%左右，PCoA2 約為 11%~33%左右，菌相組成差異(基隆市中山、台北市內湖、新北市雙溪、新北市新店)土壤與蚯蚓腸道組間差異顯著大於組內差異(ANOSIM 統計結果，基隆市中山： $R = 0.9879$ ， $p = 0.001$ 、台北市內湖： $R = 0.5178$ ， $p = 0.001$ 、新北市雙溪： $R = 0.6425$ ， $p = 0.001$ 、新北市新店： $R = 0.4552$ ， $p = 0.001$)。

四個地區土壤與蚯蚓腸道菌相的相對豐度，在菌門(phylum)的階層下(圖 14)，周界土壤以 *Acidobacteria*、*Proteobacteria*、*chloroflexi* 出現的比例最高，而蚯蚓腸道以 *Acidobacteria*、*Actinobacteria*、*Proteobacteria* 出現的比例最高；在菌綱(class)的階層下(圖 15) 周界土壤以 *Acidobacteria*、*Alphaproteobacteria*、*ktedonobacteria* 出現的比例最高，而蚯蚓腸道以 *Acidobacteria*、*Actinobacteria*、*Alphaproteobacteria* 出現的比例最高；在最小的階層中(圖 16)，菌科(Family)階層下，同時在周界土壤與蚯蚓腸道菌相比比例最高的為 DA111、*Acidobacteriaceae* (Subgroup 1)，菌屬(genus)階層中比例最高的為 *Candidatus Solibacter*、*Acidothrmus*、*Variibacter*、*Bradyrhizobium*，其中 *Acidobacteriaceae* (Subgroup 1)在四個地區的土壤與蚯蚓腸道皆出現，且土壤的比例高於蚯蚓腸道，而 *Bradyrhizobium*、*Variibacter* 則是於蚯蚓腸道的比例高於土壤。



3.3 不同蚯蚓物種間腸道前、後段菌相比較

四個地區共九種蚯蚓，比較不同種蚯蚓在消化土壤的過程中，腸道前、後段菌相物種數量差異，分析其菌相 α 多樣性，ASV richness 與 Shannon 多樣性指數皆顯示洛克斐勒遠環蚓 *A. rockefelleri* 後腸高於前腸，具有顯著差異(ASV richness : $p = 0.0391$; Shannon : $p = 0.0234$)，而天秤腔環蚓 *M. trutina* 其腸道菌相前腸高於後腸，具有顯著差異(ASV richness : $p = 0.0313$; Shannon : $p = 0.0313$)，其它物種前、後腸道菌相則無顯著差異(圖 17、表 7 ; Wilcoxon signed-rank test 如表 11)。

比較四個地區蚯蚓前、後腸菌相其菌相組成差異，基於 Bray-Curtis 相異度分析計算樣本距離矩陣，呈現於主座標分析圖 (Principal Co-ordinates Analysis, PCoA)，PCoA1 與 PCoA2 分別可以解釋 12.9 %與 11.4%的變異，根據 PCoA 結果以地區而言可將蚯蚓腸道樣本分為四群，且各地區內的蚯蚓腸道前、後腸各自分群(圖 18 ; A 圖)，若將同一隻蚯蚓腸道前、後段連線，每一條線的方向呈現一致性(圖 18 ; B 圖)。將四個地區以形狀標註、九種蚯蚓以顏色標註、蚯蚓腸道前腸以實心、後腸以空心標註(圖 19)，本研究於兩個地區皆有採集到的重複物種天秤腔環蚓 *M. trutina*、泰雅遠環蚓 *A. tayalis*、洛克斐勒遠環蚓 *A. rockefelleri*，不同地區的相同物種其 PCoA 圖中距離沒有靠近的趨勢，反而為相同地區的不同物種距離較近，不同地區的相同物種的距離較遠。單就各地區比較不同種蚯蚓前、後腸菌相組成(圖 20)，四個地區之 PCoA1 約為 16%~40%左右，PCoA2 約為 12%~15%左右，各地區以 PCoA1 將蚯蚓腸道前、後段分成兩群，以 PCoA2 可大致劃分不同蚯蚓物種。各地區以腸道不同區段而言，菌相組成組間差異(蚯蚓腸道土壤前、後腸)大於組內差異，具有顯著差異(ANOSIM 統計結果，台北市內湖 : $R = 0.5729$, $p = 0.001$ 、新北市雙溪 : $R = 0.8224$, $p = 0.001$ 、新北市新店 : $R = 0.557$, $p = 0.001$) ; 各地區以蚯蚓腸道菌相組成在不同蚯蚓物種之間組間差異大於組內差異，具有顯著差異(ANOSIM 統計結果，基隆市中山 : $R = 0.6561$, $p = 0.001$ 、台北市內湖 : $R = 0.4251$, $p = 0.001$ 、新北市雙溪 : $R = 0.5764$, $p = 0.001$ 、新北市新店 : $R = 0.4552$, $p = 0.001$)。

四個地區蚯蚓腸道前、後段菌相相對豐度，以菌門(phylum)的階層下(圖 21)，在蚯蚓前腸比例高於後腸的菌群為 *Actinobacteria*、*Chloroflexi*，而後腸比例高於前腸為 *Acidobacteria*、*Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Verrucomicrobia*。在菌綱(class)的階

層下(圖 22)，在蚯蚓前腸比例高於後腸的菌群為 *Alphaproteobacteria*、*Acidimicrobiia*、*Actinobacteria*、*Actinobacteria*、*Actinobacteria*，而後腸比例高於前腸為 *Betaproteobacteria*、*Bacilli*、*Gammaproteobacteria*。在最小的階層中，以相對豐度前 40 的菌群表示(圖 23)，在每一個蚯蚓前、後腸道樣本皆含的菌科(family)為 *alphal cluster*、*Acidobacteriaceae* (Subgroup 1)、*Acidobacteriaceae*；皆含的菌屬(genus)為 *Candidatus Solibacter*、*Bacillus*，表示這些菌群存在於蚯蚓腸道中頻率非常高且穩定。在每一個蚯蚓後腸樣本皆有出現的菌科(family)為 *Chitinophagaceae*，此科菌群主要功能為分解土壤有機物，包含幾丁質、纖維素(Rosenberg, 2014)。菌群集中在蚯蚓後腸，且相對豐度高於前腸的菌科(family)為 *Hados.Sed.Eubac.3*、*Lachnospiraceae*、*Enterobacteriaceae*、*Bacillus*；菌屬(genus)為 *Magnetospirillum*、*Enterobacter*、*Flavobacterium*；在後腸相對豐度較高的菌群其特徵為完全厭氧、兼性厭氧菌。

3.4 周界土壤與蚯蚓前、後腸菌相

針對蚯蚓腸道菌相 ASV 種數，比較其組成來自於周界土壤共享或來自於蚯蚓獨有腸道菌群，個別比較每個地區內不同種蚯蚓腸道與周界土壤之間的關係(圖 24、表 8)，各物種腸道菌相源自於蚯蚓腸道所獨有 ASV 種數為 1250~4535；而與周界土壤共享的 ASV 種數為 267~1124，蚯蚓所獨有的 ASV 在每個蚯蚓物種腸道菌相占比皆高於 50%，顯示蚯蚓腸道中獨有的 ASV 種數遠高於與土壤共享的 ASV 種數。單就蚯蚓腸道前、後段比較菌群獨特性(圖 25、表 9)，在不同種蚯蚓之間前、後腸道所共享菌群約 142~1673 個 ASV，僅在前腸獨有約 632~2749 個 ASV，僅在後腸獨有約有 347~2031 個 ASV，若比較前腸、後腸各自獨有與前、後腸共享的 ASV 比例，每種蚯蚓前、後腸道共享 ASV 比例最低，表示腸道前、後段菌群差異大且獨特性高。若篩選僅出現於蚯蚓腸道且排除出現於土壤的菌群，以菌屬(genus)階層比較(圖 26)，不同地區的相同物種分別為台北市內湖、新北市新店皆有天秤腔環蚓 *M. trutina* 與泰雅遠環蚓 *A. tayalis*，新北市雙溪與基隆市中山皆有洛克斐勒遠環蚓 *A. rockefelleri*，其菌相組成有一定程度相似，篩選出僅存在於蚯蚓腸道中的菌群且排除出現於土壤的菌群，基於 Bray-Curtis 相異度分析計算樣本距離矩陣，呈現於主座標分析圖 (Principal Co-ordinates Analysis, PCoA)(圖 26)，PCoA1 與

PCoA2 分別可以解釋 8.7 %與 7.2 %的變異，以地區而言可劃分為四群，蚯蚓腸道菌相組成組間差異(基隆市中山、台北市內湖、新北市雙溪、新北市新店)大於組內差異，具有顯著差異(ANOSIM 統計結果 $R=0.7297$, $p=0.001$)，以蚯蚓物種而言，蚯蚓腸道菌相組成組間差異大於組內差異(ANOSIM 統計分析， $R=0.5451$, $p=0.001$)，其中內湖、新店皆有的天秤腔環蚓 *M. trutina*，在 PCoA 圖中的距離相近，表示分析僅出現於蚯蚓腸道中獨有的菌相，不同地區的相同物種天秤腔環蚓 *M. trutina* 腸道菌相組成相似，而洛克斐勒遠環蚓 *A. rockefelleri* 與泰雅遠環蚓 *A. tayalis* 此趨勢較不明顯。

接著比較蚯蚓前、後腸道菌相中與周界土壤的相似程度(圖 28、表 10、表 11)，在前、後腸共享的菌相中有 57~623 個 ASV 同時於周界土壤中出現，在蚯蚓腸道中占比約 3.3%~20%；僅在前腸獨有的菌相中約有 54~372 個 ASV 同時於周界土壤中出現，在蚯蚓腸道中占比約 1.7%~18%；僅在後腸獨有的菌相中約有 7~422 個 ASV 同時於周界土壤中出現，在蚯蚓腸道中占比約 0.4%~15.3%，大多數蚯蚓腸道菌相與周界土壤相似度最低為前腸菌群，而新店 *M. trutina*、內湖 *M. trutina*、sp14，與周界土壤相似比例最低為後腸菌群。若篩選同時出現於蚯蚓前、後腸道與土壤中的菌群，以最小的階層比較(圖 29)，土壤與蚯蚓腸道之間在菌群相對豐度與出現的頻率上略有不同，篩選出同時存在於蚯蚓前、後腸道中的菌群，基於 Bray-Curtis 相異度分析計算樣本距離矩陣，呈現於主座標分析圖 (Principal Co-ordinates Analysis, PCoA)(圖 30)，PCoA1 與 PCoA2 分別可以解釋 17.5 %與 13.3 %的變異，以地區而言，菌相組成組間(基隆市中山、台北市內湖、新北市雙溪、新北市新店)差異大於組內差異(ANOSIM 統計分析， $R=0.3927$, $p=0.001$)，此外，圖中可以將樣本分為蚯蚓前腸、後腸、土壤三群，菌相組成組間差異(周界土壤與蚯蚓腸道土壤前、後腸)大於組內差異，具有顯著差異(ANOSIM 統計分析， $R=0.4668$, $p=0.001$)，且圖中後腸與前腸分別與土壤相比，菌相組成為後腸與土壤距離更近。

3.5 蚯蚓腸道菌相反映蚯蚓營養位階

由同位素的結果得知不同蚯蚓生態群在營養位階上的差異，比較不同營養位階的蚯蚓其腸道微生物菌相，以蚯蚓腸道菌群以最小分類階層表示，基於 Bray-

Curtis 相異度分析計算樣本距離矩陣，呈現於主座標分析圖 (Principal Co-ordinates Analysis, PCoA)(圖 31)，PCoA1 與 PCoA2 分別可以解釋 20.5 %與 13.0 %的變異，以四種蚯蚓生態群而言，菌相組成組間差異(Anecic、Epi-endogeic、Polyhumic endogeic、Mesohumic endogeic)大於組內差異(ANOSIM 統計分析， $R=0.2866$ ， $p=0.001$)；以蚯蚓腸道不同區段而言，菌相組成組間差異(蚯蚓腸道前、後腸)大於組內差異(ANOSIM 統計分析， $R=0.4448$ ， $p=0.001$)。PCoA 圖上，差異最大的為蚯蚓前、後腸，其次為不同生態群蚯蚓。蚯蚓前腸與後腸樣本距離差距明顯，以最具代表性的軸線 PCo1 劃分為兩群；且無論在蚯蚓腸道中各區段，以生態群劃分蚯蚓腸道菌相有規律性的分布，PCoA 圖由左上到右下依序為 Anecic、Epi-endogeic、Polyhumic endogeic、Mesohumic endogeic，蚯蚓生態群呈現規律性的分布對照其穩定同位素結果， $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 數值由低至高。

肆、討論

本實驗首次，結合穩定同位素與次世代定序，同時分析蚯蚓的食性差異與生態棲位，以及蚯蚓周界土壤及腸道土壤細菌相。穩定同位素分析結果顯示(1)不同生態群的蚯蚓碳 13、氮 15 穩定同位素棲位具有差異；(2)同位素棲位可將蚯蚓傳統界定的三個生態群更詳細劃分為四個生態群；(3)在亞熱帶次生林中，無論是落葉或土壤，皆不適用於標準化不同地區蚯蚓穩定同位素數值，直接利用原始數值不試圖做標準化反而可呈現較佳的生態意義。

次世代定序的結果顯示(1)所有樣本中，菌相組成主要受到不同採集樣區影響；(2)蚯蚓取食及消化的過程影響土壤菌相組成，蚯蚓所在的周界土壤與蚯蚓的前腸、後腸土壤菌相組成具有差異；(3)周界土壤、蚯蚓腸道前、後腸各自獨有的 ASV 種數遠高於互相共有的 ASV 種數，且比起蚯蚓前腸土壤，後腸土壤與周界土壤所共有的 ASV 種數較多，菌相組成較相似；(4)綜合穩定同位素分析結果所劃分蚯蚓生態群，蚯蚓腸道菌相組成在不同生態群的蚯蚓之間的差異具有一致性。

4.1 落葉、土壤、蚯蚓組織的穩定同位素值

蚯蚓的棲地主要為落葉層與土壤層，這兩者也同時是蚯蚓的食物來源。本實驗結果顯示隨著土壤剖面由淺到深(落葉、土壤 0-5 cm、土壤 15-20 cm)， $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 數值越大，此現象與落葉分解程度與土壤有機質分解的不同階段有關，若受到微生物分解程度越高， $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 數值越大，但是在此過程中土壤環境的溫度、濕度、pH 值、植被的類型也會造成一定程度的差異(Ehleringer et al., 2000)。

落葉中的 $\delta^{13}\text{C}$ 數值主要受到環境中不同類型植物的影響。由於 C3、C4 植物光合作用的方式不同，行固碳作用具有不同的途徑，C3、C4 植物利用不同的固碳途徑將大氣中初獲得二氧化碳固定，由於 C3、C4 植物對 ^{12}C 、 ^{13}C 的分化作用不同， $\delta^{13}\text{C}$ 在 C3 植物會低於 C4 植物(Zeiger and Zhu, 1998)。一般而言 $\delta^{13}\text{C}$ 的分析是植物固碳途徑的判定方法，C3 植物 $\delta^{13}\text{C}$ 值介於-38 ‰ ~ -20 ‰間，C4 植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值介於-17 ‰ ~ -8 ‰間，兩者無重疊區。台灣的次森林中木本植物多數都屬於 C3 植

物，而本研究所採集的落葉之 $\delta^{13}\text{C}$ 範圍落在-32.23 ‰與-30.12 ‰ 之間，與 C3 植物的數值吻合。

同一個採集樣區中，基礎食物來源相同，然而不同物種蚯蚓的 $\delta^{13}\text{C}$ 與 $\delta^{15}\text{N}$ 數值具差異，顯示不同物種在進食的過程中具有選擇性，形成獨特的同位素棲位。而依據在二維空間下的同位素棲位大小，可推估對於食物資源的專一性；同位素棲位範圍越廣者為廣食性、越窄者為專食性。

新北市雙溪採集的兩種蚯蚓，傳統上皆分類為底層型，兩種蚯蚓 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 平均值差異分別為 0.56‰、2.81‰，指出此兩種底層型的蚯蚓之間，相差了近一個營養階層，可劃分為兩個穩定同位素棲位；在基隆市中山有六種蚯蚓，傳統上可分類為底層型與表層型蚯蚓，*A. corticis* 長久以來被視為表層型蚯蚓，此種蚯蚓廣泛分布於台灣各地的公園與校園綠地、次生林，雖然本次採集中僅有一隻，然而依據 *A. corticis* 與採集樣區內其他底層型蚯蚓差異明顯， $\delta^{13}\text{C}$ 較後者低了 0.69~0.95‰、 $\delta^{15}\text{N}$ 低了 1.90~4.34‰，與傳統上的生態群分類一致，為以落葉層、腐植層為食的表層型蚯蚓。而此樣區中其他五種底層型蚯蚓 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 平均值差異分別落在-26.03‰~-25.87‰、3.57‰~6.01‰，此五種底層型的蚯蚓之間穩定同位素棲位相差了一個營養階層，可劃分為兩個穩定同位素棲位。值得注意的是 *A. minimus* 在 $\delta^{13}\text{C}$ 數值範圍最寬，這類型的蚯蚓體型相較其他蚯蚓特別小，成體僅有 2.4-3.2 cm (Horst, 1893)，推測體型上的限制使其活動範圍有限，僅可利用分解程度較高的土壤有機質為食，食性為廣食性補足食物資源競爭上的劣勢。台北市內湖有兩種蚯蚓分別為貫穿型與表層型蚯蚓，由於表層型與貫穿型蚯蚓都以落葉層為食，因此同位素棲位相近，本實驗所採集到的貫穿型蚯蚓的 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 數值較底層型蚯蚓更低，表示貫穿型蚯蚓以較新鮮的腐植質、落葉為食。新北市新店同時採集到五種蚯蚓，三個生態群在此地區皆出現， $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 數值範圍最廣，此地區蚯蚓的 $\delta^{15}\text{N}$ 平均值差異落在-0.98 ‰與 3.15‰之間；*M. trutina* 的穩定同位素棲位為分布最廣者，推測為貫穿型的蚯蚓，挖掘長達數十公分的垂直洞穴，此過程中會攝入不同土層的土壤，涵蓋了土壤剖面中的落葉層、表土層、底土層，因此穩定同位素數值上變動幅度最大。

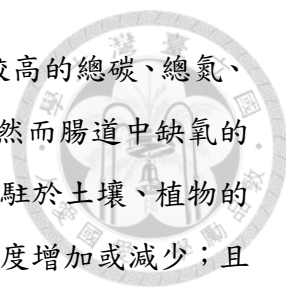
近年來許多關於土壤食物網中營養位階的研究皆會利用穩定同位素分析；由於在野外不容易直接觀察到土壤動物的取食行為、食性偏好，穩定同位素成為一個很好的探測工具。然而，在不同的樣點之間，由於季節、降水量、溫度、土壤濕度、

植被類型、土壤結構的差異，導致不同樣點的基礎食物資源 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 數值不同 (Eisenhauer et al., 2009)，為了將不同樣點的土壤動物營養位階進行比較或合併再一起分析，常規的作法是以落葉做標準化(Korobushkin et al., 2014; Potapov et al., 2016)。落葉作為土壤食物網基礎食物來源，在溫帶森林研究中，森林相的植被物種單一，落葉的時期一致，採樣也多集中在夏季，使得落葉成為不同採集地區標準化相當合適的選擇。然而台灣的低海拔次生林屬於常綠闊葉林，以雜木林占多數，不同樹種落葉的季節不同，落葉分解的速率也不一樣，使得一年中不同月份採集到的落葉無論在物種組成與各物種的分解程度上皆可能有相當程度得差異；因此，與溫帶森林不同，我們所採集到的落葉無法用來代表土壤動物所利用的基礎食物資源，不適合做為標準化的基準。因此，我們分別以原始數值分析，或是以 0-5 cm 土壤嘗試進行標準化，作為合併採樣區統整蚯蚓營養位階的參考依據；結果顯示原始數值最能反映不同蚯蚓物種的生態差異，其結果也最符合我們對這些蚯蚓物種生態與食性上已知的資訊。

本研究將原先在傳統分類上三種生態群，依循前人的定義延伸出四種生態群，分別為 Mesohumic endogeic、Polyhumic endogeic、Epi-endogeic、Anecic (Lavelle, 1981)。我們使用量化的方式分析蚯蚓的食性，不再完全依靠觀察與研究者的個人經驗；本研究依據穩定同位素劃分生態棲位，結果與前人的認知相符，劃分出更詳細的蚯蚓生態群不僅可以清楚的了解蚯蚓物種之間的營養位階，在野外標準化的採集證實蚯蚓在原棲地中選擇食物資源的差異。

4.2 周界土壤與蚯蚓腸道土壤菌相組成差異

本實驗結果指出大多數地區在周界土壤與蚯蚓腸道土壤菌相中，物種豐富度沒有顯著差異，僅在雙溪地區周界土壤略高於蚯蚓腸道土壤，表示總和 ASV 種數，兩者沒有差異；然而 Shannon 多樣性指數在台北市內湖、新北市雙溪具有顯著差異，表示將菌群豐富度與均勻度納入後，土壤菌相物種多樣性較高；此結果與前人研究相符，Wang et al. (2021)以 *Eisenia fetida* 作為實驗物種，透過次世代定序，比較食物來源與蚯蚓腸道前、中、後段菌相差異， α 多樣性分析顯示食物來源高於蚯蚓中腸土壤，而食物資源略高於蚯蚓腸道前、後腸道。



蚯蚓腸道作為細菌微棲地，富集營養物質，相對於土壤，有較高的總碳、總氮、醣類、胺基酸的含量，含水量約為 40-65% (Horn et al., 2003)。然而腸道中缺氧的環境與消化道黏液具有不同分解酵素(Byzov et al., 2015)，導致常駐於土壤、植物的細菌無法適應此環境；因此，腸道可過濾特定菌群，使其相對豐度增加或減少；且蚯蚓腸道本身具有獨特的菌群，其與蚯蚓所在環境中共有的菌群比例低 (Domínguez et al., 2021)。本實驗結果比較蚯蚓腸道土壤與周界土壤 ASV 共享程度，顯示兩者所共有的 ASV 數量極少，代表蚯蚓仰賴腸道中獨有的細菌分解物質以獲取能量，而非透過土壤既有的微生物來分解物質，與前人的研究結果相符 (Sampedro et al., 2006)，且在蚯蚓的糞土與周界土壤之間的比較也有相同的趨勢 (Domínguez et al., 2021)。周界土壤與蚯蚓腸道中皆有出現的優勢菌門為 *Acidobacteria*、*Chloroflexi*、*Proteobacteria*；其中 *Acidobacteria* 在腸道中相對豐度明顯下降，*Acidobacteria* 具有嗜酸性與貧養性的特點 (Fierer et al., 2007; Leff et al., 2015) 其分類階層下的 *Solibacteraceae* 與 *Koribacteraceae* 在周界土壤中相對豐度較高，由於蚯蚓腸道環境 pH 值為接近中性，且腸道黏液中的分解酶可增進食物分解，使得總碳源增加 (Drake and Horn, 2007)，可能是導致菌群在蚯蚓腸道中相對豐度降低的原因。另外，菌群最小分類階層在周界土壤中幾乎沒有出現的 *Enterobacteriaceae*，卻在蚯蚓腸道中數量眾多，此結果與 Pass et al. (2015) 比較農田中土壤與 *Lumbricus rubellus* 腸道土壤菌相組成研究，結果相同。*Enterobacteriaceae* 生長於厭氧的環境，在蚯蚓的腸道中可以利用葡萄糖作為碳源進行發酵作用 (Wüst et al., 2011)，此菌群廣泛出現在動物的腸道中，可能作為具有功能性有益於腸道中的共生菌群。

4.3 蚯蚓腸道土壤前、後腸菌相組成

本實驗結果顯示 α 多樣性在大多數蚯蚓腸道土壤菌相在前、後腸物種豐富度與 Shannon 多樣性指數沒有顯著差異，僅有 *M. trutina* 與 *A. rockefelleri* 前、後腸之間，具有顯著差異。前人以 *E. fetida* 在不同底材養殖蚯蚓，利用次世代定序分析其腸道前、中、後腸之菌相，結果顯示 α 多樣性在蚯蚓腸道不同區段先減少而後增加，然而前、後腸分別與中腸菌相具有顯著差異 (Wang et al., 2021)；Khomyakov et al. (2007) 將 *Aporrectodea caliginosa* 蚯蚓腸道前、後腸消化液進行微生物培養，發

現以前腸的消化液作為培養對細菌有強烈的選擇性且減少細菌的活性，而以後腸的消化液作為培養則沒有此現象。然而，不同物種的蚯蚓，結果可能不一致；Byzov et al. (2007)以 PLFA 分析 *L. terrestris* 蚯蚓中、後腸道微生物組成，無論是在真菌、原生生物、細菌的生物量在蚯蚓腸道不同區段中並沒有顯著差異。前人研究指出蚯蚓 *L. terrestris* 中總氮、總碳、水溶性有機質、亞硝酸鹽、銨、亞鐵的濃度在前腸較高，隨著前腸到後腸遞減(Wüst et al., 2009)。在本研究解剖蚯蚓的過程中，也注意到前腸的含水量較高、後腸的含水量較低。整體而言，影響蚯蚓前、後腸道菌相的原因，推測為腸道中不同區段微棲地的環境條件差異，導致抑制菌群的程度不同，而不同種類的蚯蚓也會影響。

本研究中蚯蚓腸道中的優勢菌群為 *Actinobacteria*、*Acidobacteria*、*Bacteroidetes*、*Firmicutes*、*Proteobacteria*，與文獻中研究蚯蚓腸道菌相相符(Brantschen et al., 2020; Sapkota et al., 2020; Wang et al., 2021; Aira et al., 2022)。*Firmicutes* (*Bacillus*)與 *Actinobacteria* (*Micrococcales*)皆為孢子生成菌(spore-forming bacteria)，孢子能夠抵禦蚯蚓腸道中的消化液，而後在適當環境下，可再度持續生長(Gómez-Brandón et al., 2020)。Gómez-Brandón et al. (2011)透過磷脂脂肪酸(PLFA)分析蚯蚓腸道菌相，指出腸道中格蘭氏陰性菌比例增加、格蘭氏陽性菌比例降低；格蘭氏陰性菌由於細胞膜具有脂多醣 (lipopolysaccharides)，使這類型的菌群對於腸道中黏液及分解酵素有更好的耐受性(Lüderitz et al., 1982)；在本研究中以菌綱階層比較蚯蚓前、後腸道相對豐度，其中，*Bacteroidetes*、*Verrucomicrobia* 皆屬格蘭氏陰性菌，在蚯蚓的消化道中此類型的菌群從前腸至後腸相對豐度逐漸增加。在腸道中占比最高的菌門 *Proteobacteria*，其分類階層下的菌目 *Frankiales* 與 *Rhizobiales* 為共生於植物根系的功能性菌群，可行固氮作用，與蚯蚓進食根域周遭的土壤有關(Normand et al., 2007)。*Actinobacteria* 其分類階層下的菌科 *Streptomyetaceae* 可以產生纖維素分解酵素，協助腸道中植物枯落物的分解(Korn-Wendisch and Kutzner, 1992)；*Mycobacteriaceae* 在腸道中可協助利用土壤的腐植酸、促進氮循環(Ventura et al., 2007)。蚯蚓消化道的不同區段中，大多數的蚯蚓物種腸道菌相 α 多樣性沒有顯著差異，但蚯蚓腸道前、後腸的菌相物種組成具有顯著差異，推測此現象與消化道不同區段微棲地環境條件有關。

4.4 周界土壤與蚯蚓腸道土壤前、後腸菌相組成結構

前人研究指出土壤微生物在通過蚯蚓腸道的過程中 α 多樣性下降並將這樣的現象視為瓶頸效應(bottleneck)(Hu et al., 2020)，從進食前的周界土壤到腸道土壤，最後到排出的糞土，微生物在前腸會受到環境選汰，僅留下足以在腸道環境下生存的菌群，隨著後腸至排出的糞土，特定菌群數量與豐富度逐漸上升(Brantschen et al., 2020; Hu et al., 2020; Wang et al., 2021)。本研究中比較九種不同蚯蚓物種之間腸道不同區段菌相，僅有兩種蚯蚓腸道前、後菌相具有顯著差異，且兩種蚯蚓具有相反的結果，而其餘七種蚯蚓前、後腸菌相豐富度與物種多樣性沒有顯著差異，與前人結果不相符。在台北市內湖與新北市雙溪採集的蚯蚓，蚯蚓所在周界土壤到蚯蚓腸道土壤菌相 α 多樣性降低，反映出此結果有三種推測，其一，蚯蚓本身選擇性的進食(selective feeding)，選擇特定食物使得蚯蚓腸道與周界土壤相比 α 多樣性下降，卻不能明確指出蚯蚓消化道中發生瓶頸效應；其次，若蚯蚓消化道會產生瓶頸效應，可能早在前腸以前的消化器官，如咽、食道、嗉囊、砂囊即受到環境選汰，而我們所看到的現象為篩選過後的結果，無法確切指出在蚯蚓前腸區段發生瓶頸效應；最後，瓶頸效應確實發生在蚯蚓前腸區段，使得蚯蚓腸道與周界土壤相比 α 多樣性下降，符合本實驗的觀察結果。綜合上述，本研究的結果並沒有足夠的證據證明瓶頸效應發生在蚯蚓前腸。本研究的結果顯示蚯蚓周界土壤與腸道土壤菌群組成有顯著差異，由此可知外在周界土壤與蚯蚓腸道兩種截然不同的環境條件塑造不同的菌群結構，同時也指出蚯蚓腸道內不同區段，在前、後腸菌相的 α 多樣性在大多數的蚯蚓物種中沒有顯著差異；然而細看內部菌相分類階層上則具有顯著差異，表示前、後腸微棲地的變化確實影響菌相組成。

不同地區環境因子的差異會影響土壤微生物組成，例如溫度、濕度、植被種類、土壤結構及人為干擾等(Fierer, 2017)；另外尚有生物因子之間的交互作用，利如微生物之間的族群消長、寄生、互利共生及根圈周圍微生物的交互作用(Sokol et al., 2022)；因此，菌群組成受到地區性差異的影響是可預期的。本實驗在不同地區採集到幾個相同的蚯蚓物種，包括 *A. rockefelleri*、*A. tayalis* 與 *M. trutina*；蚯蚓腸道菌相組成與相同地區的不同物種相比，不同地區的相同物種的 Bray-Curtis 距離並沒有降低的趨勢，反映出腸道菌相組成明顯受到地區效應影響。而將蚯蚓腸道獨

有(也就是未出現於周界土壤)的菌群獨立出來分析，以最小的分類階層呈現於熱點圖上，在 *A. rockefelleri*、*A. tayalis* 與 *M. trutina* 中，不同地區的相同物種蚯蚓個體菌群分布相似，基於 Bray-Curtis 計算樣本距離矩陣以 PCoA 分析，此三種蚯蚓各自距離相近，顯示腸道中獨有的菌相組成一定程度上相似；然而，即便將蚯蚓腸道獨有的菌相所獨立出來，地區性的差異依然存在，顯示腸道菌相組成受到各地區土壤物理、化學特性的差異，各地區落葉種類、腐植質腐化的程度使得環境微生物之間的差異。Liu et al. (2018) 養殖 *Eisenia fetida* 進行操作實驗，分析飼養於營養貧瘠與富含營養的土壤進行比較，發現蚯蚓腸道菌相具有核心的菌群不受到環境變動，然而進食營養來源組成差異越大的食物，腸道中菌相組成差異越明顯。本研究結果顯示不僅僅是堆肥常使用的 *Eisenia fetida* 於養殖環境中有這樣的現象，自然環境中其他的蚯蚓物種也有類似的情形。

同時比較周界土壤與蚯蚓腸道前、後腸中共有的菌群，周界土壤與蚯蚓腸道後腸菌相組成較相似，整體而言，後腸與周界土壤共有的 ASV 數較高，在菌群物種組成中以周界土壤與蚯蚓後腸菌相組成與前腸相比 Bray-Curtis 距離更近，推測可能為蚯蚓腸道前腸到後腸微棲地中含水量、有機碳、醣類逐漸減少，蚯蚓與腸道菌群將可利用的營養物質吸收，而後排放出來至糞土，因此相對於營養富集的前腸，後腸與周界土壤的菌群組成較相似。

4.5 蚯蚓生態群與其腸道菌相

以細菌的有效學名最小分類階層下進行群聚分析，無論在蚯蚓的前腸或後腸，同一個生態群的蚯蚓彼此間菌相組成較為相似，且不同生態群的蚯蚓腸道菌相有一定程度的規律，依序為 Anecic、Epi-endogeic、Polyhumic endogeic、Mesohumic endogeic。前人利用次世代定序研究蚯蚓腸道菌的研究中，大多僅聚焦在單一物種，例如正蚓科的 *Aporrectodea caliginosa*、*Lumbricus terrestris* 與 *Eisenia fetida* (Aira et al., 2019; Brantschen et al., 2020; Wang et al., 2021; Aira et al., 2022)，僅有 Sapkota et al. (2020) 曾比較自然環境中不同生態群的蚯蚓物種。上述研究分析了居住於溫帶草原的三種底層型(皆為 polyhumic endogiec)與一種貫穿型蚯蚓，發現貫穿型蚯蚓與底層型蚯蚓腸道菌相組成有顯著差異。本研究不僅僅支持 Sapkota et al. (2020) 的發

現，更顯示出在四個功能群間皆能看到類似的差異，且即使跨越了來自 4 個樣區的 9 個物種，這樣的現象仍相當明顯。此外，前人研究的物種皆為屬於正蚓科的廣佈種，廣泛分布於全球溫帶地區；我們研究的 9 種蚯蚓皆屬於巨蚓科，包含了 3 個廣佈種與 6 個台灣特有種，顯示生態群間腸道菌相的差異不僅只存在於正蚓科或廣佈種蚯蚓中，也不僅見於溫帶草原，亦出現在亞熱帶森林的巨蚓科中，且涵蓋分布相當侷限的特有種蚯蚓。

伍、結論

本研究以北台灣次森林的蚯蚓為研究對象，探討自然棲地中的蚯蚓在不同群聚組成下營養位階與食性差異。即便蚯蚓的食物來源看似單一，僅以環境中的土壤與植物體的凋落物為食，然而蚯蚓會因為活動範圍、取食偏好差異而分類為不同生態群。

以同位素的分析顯示活動範圍僅在土壤中、且偏好以土壤為食的底層型蚯蚓，其穩定同位素 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 數值相對較高；而表層型與貫穿型蚯蚓活動範圍可達到落葉層中、偏好落葉與初步腐化的有機質為食，其穩定同位素 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 數值相對較低，差別源自於食物資源受到土壤礦化作用的影響程度與微生物所分解的程度影響。而本研究依據 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 所界定的同位素棲位的差異，將蚯蚓生態群界定為 anecic—主要取食落葉並少量攝取土壤中的腐植質、epi-endogeic—取食落葉及表土層中的腐植質、polyhumic endogeic—取食礦物質含量較低且有機質含量較高的土壤、mesohumic endogeic—取食礦物質含量較高且有機質含量較低的土壤。此四群的概念與傳統分群一致，然而穩定同位素提供量化且更明確的證據顯示蚯蚓生態群之間營養位階的差異。

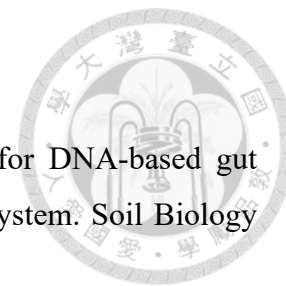
以細菌 16S rRNA 搭配次世代定序分析蚯蚓腸道菌相物種組成，我們發現不同生態群的蚯蚓菌相組成亦有明顯不同，其結果與同位素分析的結果一致：anecic 與 mesohumic endogeic 位於兩端，中間為 epi-endogeic 與 polyhumic endogeic。這是首個利用穩定同位素與腸道菌相探討蚯蚓生態群的研究，顯示食性的不同會反映在腸道微生物的群聚上。

蚯蚓在取食的過程中，從周界土壤到消化道中的不同區段菌相組成亦有明顯的差異。即便蚯蚓以大量的土壤為食，蚯蚓的腸道與周界土壤菌相組成頗為不同，蚯蚓在取食時有選擇性，腸道則會過濾掉無法存活於腸道環境的菌群；然而微棲地環境條件的差異使得蚯蚓腸道的前、後腸菌群的分布也不一致。綜合來看，最大程度影響蚯蚓腸道微生物的組成為各地區環境微生物組成差異，地區差異使得相同物種的蚯蚓在不同採集樣地其腸道菌相組成差異甚距。然而，與前腸相比，後腸的菌相與周界土壤較為接近，顯示蚯蚓一定程度上會影響棲地環境中的土壤菌相組成。此外，蚯蚓腸道微生物菌相組成中僅有少部分與土壤相似，大多數菌群為蚯蚓

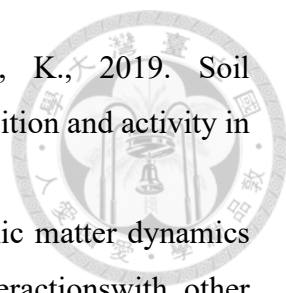
腸道所獨有，顯示雖然蚯蚓腸道菌相會受到環境影響，蚯蚓腸道有獨特的細菌群聚，而蚯蚓排出的糞土亦可能改變周界土壤菌相。

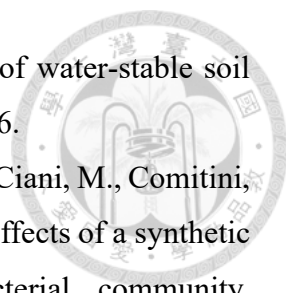
野外生物與外在環境因子交互作用比起實驗室養殖更為複雜，我們需要更多的研究以了解蚯蚓腸道菌相影響因子，應用現有的分子技術能夠快速的分析蚯蚓腸道菌群間的組成，但若要了解宿主體內生理代謝功能與實際表現特性，則需要更多的生化分析加以佐證。

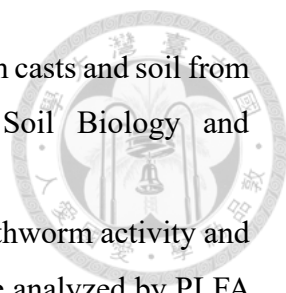
陸、參考文獻

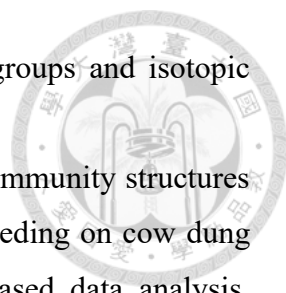


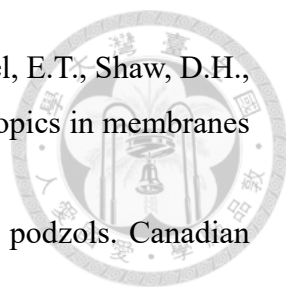
- Admassu, B., Juen, A., Traugott, M., 2006. Earthworm primers for DNA-based gut content analysis and their cross-reactivity in a multi-species system. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1308-1315.
- Aichberger, R.v., 1914. Studies on the nutrition of earthworms. *Kleinwell* 6, 85-88.
- Aira, M., Pérez-Losada, M., Crandall, K.A., Domínguez, J., 2022. Composition, Structure and Diversity of Soil Bacterial Communities before, during and after Transit through the Gut of the Earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Microorganisms* 10, 1025.
- Aira, M., Pérez-Losada, M., Domínguez, J., 2019. Microbiome dynamics during cast ageing in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Applied Soil Ecology* 139, 56-63.
- Barois, I., Lavelle, P., 1986. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry* 18, 539-541.
- Bassalik, K., 1913. Über die Verarbeitung der Oxalsäure durch *Bacillus extorquens* n. sp. Universität Basel.
- Bhatnagar, T., 1975. Lumbricids and humification: a new aspect of the microbial incorporation of nitrogen induced by earthworm. *Biodégradation et humification*. Pierron, Nancy, France, 168-182.
- Bouché, M., 1977. Strategies lombriciennes. *Ecological Bulletins*, 122-132.
- Bouché, M., 1981. Contribution des lombriciens aux migrations d'éléments dans les sols tempérés. Migrations organo-minérales dans les sols tempérés, *Colloques Internationaux du CNRS n° 303*, 145-154.
- Bouché, M., Ferriere, G., 1985. Première mesure ecophysiologique d'un débit d'élément dans un animal endogé: le débit d'azote de *Nicodrilus longus longus* (Ude)(Lumbricidae, Oligochaeta) dans la prairie de Cîteaux. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie* 301, 789-794.
- Brady, N.C., Weil, R.R., Weil, R.R., 2008. The nature and properties of soils. Prentice Hall Upper Saddle River, NJ.
- Brantschen, J., Gyax, S., Mestrot, A., Frossard, A., 2020. Soil Hg contamination impact on earthworms' gut microbiome. *Applied Sciences* 10, 2565.

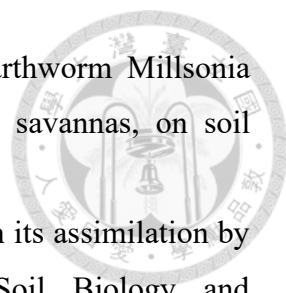
- 
- Bray, N., Kao-Kniffin, J., Frey, S.D., Fahey, T., Wickings, K., 2019. Soil macroinvertebrate presence alters microbial community composition and activity in the rhizosphere. *Frontiers in microbiology* 10, 256.
- Brown, G.G., Barois, I., Lavelle, P., 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *European Journal of Soil Biology* 36, 177-198.
- Byzov, B., Tikhonov, V., Nechitailo, T.Y., Demin, V., Zvyagintsev, D., 2015. Taxonomic composition and physiological and biochemical properties of bacteria in the digestive tracts of earthworms. *Eurasian Soil Science* 48, 268-275.
- Byzov, B.A., Khomyakov, N.V., Kharin, S.A., Kurakov, A.V., 2007. Fate of soil bacteria and fungi in the gut of earthworms. *European Journal of Soil Biology* 43, S149-S156.
- Callahan, B.J., Mcmurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13, 581-583.
- Chang, C.-H., Chen, J.-H., 2005. Taxonomic status and intraspecific phylogeography of two sibling species of *Metaphire* (Oligochaeta: Megascolecidae) in Taiwan. *Pedobiologia* 49, 591-600.
- Chang, C.-H., Lin, S.-M., Chen, J.-H., 2008. Molecular systematics and phylogeography of the gigantic earthworms of the *Metaphire formosae* species group (Clitellata, Megascolecidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49, 958-968.
- Chang, C.-H., Shen, H.-P., Chen, J.-H., 2009. 台灣蚯蚓誌
Earthworm Fauna of Taiwan. 國立臺灣大學出版中心.
- Chang, C.H., Szlavecz, K., Filley, T., Buyer, J.S., Bernard, M.J., Pitz, S.L., 2016. Belowground competition among invading detritivores. *Ecology* 97, 160-170.
- Cooke, J., 1983. The effects of fungi on food selection by *Lumbricus terrestris* L, *Earthworm ecology*. Springer, pp. 365-373.
- Curry, J., Byrne, D., 1992. The role of earthworms in straw decomposition and nitrogen turnover in arable land in Ireland. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 1409-1412.
- Curry, J.P., Schmidt, O., 2007. The feeding ecology of earthworms—a review. *Pedobiologia* 50, 463-477.
- Dawson, R.C., 1948a. Earthworm Microbiology and the Formation of Water-stable Soil Aggregates. *Soil Science Society of America Journal* 12, 512-516.

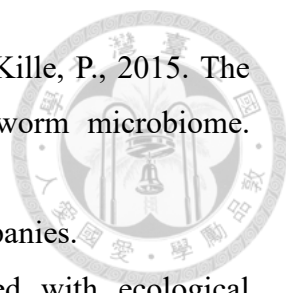
- 
- Dawson, R.C., 1948b. Earthworm microbiology and the formation of water-stable soil aggregates. *Soil Science Society of America Journal* 12, 512-516.
- De Bernardi, A., Marini, E., Casucci, C., Tiano, L., Marcheggiani, F., Ciani, M., Comitini, F., Taskin, E., Puglisi, E., Vischetti, C., 2022. Ecotoxicological effects of a synthetic and a natural insecticide on earthworms and soil bacterial community. *Environmental Advances* 8, 100225.
- DeNiro, M.J., Epstein, S., 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et cosmochimica acta* 42, 495-506.
- Dickschen, F., Topp, W., 1987. Feeding activities and assimilation efficiencies of *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae) on a plant-only diet. *Pedobiologia (Jena)* 30, 31-37.
- Domínguez, J., Aira, M., Crandall, K.A., Pérez-Losada, M., 2021. Earthworms drastically change fungal and bacterial communities during vermicomposting of sewage sludge. *Scientific Reports* 11.
- Drake, H.L., Horn, M.A., 2007. As the Worm Turns: The Earthworm Gut as a Transient Habitat for Soil Microbial Biomes. *Annual Review of Microbiology* 61, 169-189.
- Edwards, C., Heath, G., 1963. The role of soil animals in breakdown of leaf material. *Soil organisms*, 76-84.
- Edwards, C., Lofty, J., 1972. Earthworms and microorganisms, *Biology of Earthworms*. Springer, pp. 155-162.
- Edwards, C.A., 1997. *Earthworm ecology*. CRC press.
- Edwards, C.A., Bohlen, P.J., 1996. *Biology and ecology of earthworms*. Springer.
- Edwards, C.A., Fletcher, K., 1988. Interactions between earthworms and microorganisms in organic-matter breakdown. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 24, 235-247.
- Eggleton, P., Tayasu, I., 2001. Feeding groups, lifetypes and the global ecology of termites. *Ecological Research* 16, 941-960.
- Ehleringer, J.R., Buchmann, N., Flanagan, L.B., 2000. CARBON ISOTOPE RATIOS IN BELOWGROUND CARBON CYCLE PROCESSES. *Ecological Applications* 10, 412-422.
- Eisenhauer, N., Milcu, A., Sabais, A.C., Bessler, H., Weigelt, A., Engels, C., Scheu, S., 2009. Plant community impacts on the structure of earthworm communities depend on season and change with time. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 2430-2443.

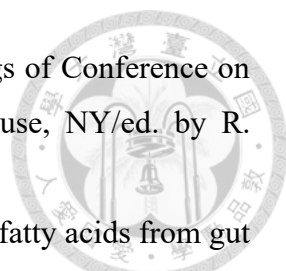
- 
- Elliott, P., Knight, D., Anderson, J., 1990. Denitrification in earthworm casts and soil from pastures under different fertilizer and drainage regimes. *Soil Biology and Biochemistry* 22, 601-605.
- Enami, Y., Okano, S., Yada, H., Nakamura, Y., 2001. Influence of earthworm activity and rice straw application on the soil microbial community structure analyzed by PLFA pattern. *European Journal of Soil Biology* 37, 269-272.
- Fierer, N., 2017. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology* 15, 579-590.
- Fierer, N., Bradford, M.A., Jackson, R.B., 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88, 1354-1364.
- Fierer, N., Strickland, M.S., Liptzin, D., Bradford, M.A., Cleveland, C.C., 2009. Global patterns in belowground communities. *Ecology Letters* 12, 1238-1249.
- Folmer, O.F., Black, M.B., Hoeh, W.R., Lutz, R.V., Vrijenhoek, R.C., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology* 3 5, 294-299.
- Fox, J., Weisberg, S., 2011. *An R companion to applied regression*. Sage. Thousand Oaks.
- Freschet, G.T., Aerts, R., Cornelissen, J.H.C., 2012. A plant economics spectrum of litter decomposability. *Functional Ecology* 26, 56-65.
- Gómez-Brandón, M., Aira, M., Lores, M., Domínguez, J., 2011. Epigeic Earthworms Exert a Bottleneck Effect on Microbial Communities through Gut Associated Processes. *PLoS ONE* 6, e24786.
- Gómez-Brandón, M., Aira, M., Santana, N., Pérez-Losada, M., Domínguez, J., 2020. Temporal Dynamics of Bacterial Communities in a Pilot-Scale Vermireactor Fed with Distilled Grape Marc. *Microorganisms* 8, 642.
- Hebert, P.D., Ratnasingham, S., De Waard, J.R., 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270, S96-S99.
- Horn, M.A., Schramm, A., Drake, H.L., 2003. The earthworm gut: an ideal habitat for ingested N₂O-producing microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1662-1669.
- Horst, R., 1893. Descriptions of earthworms. *Notes from the Leyden Museum* 15, 316-329.

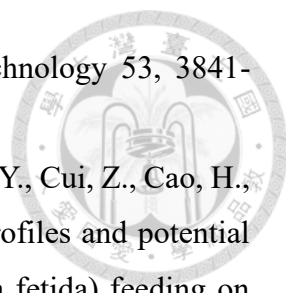
- 
- Hsu, G.C., Bernard, K.S.C.C.M., Chang, C.H., 2022. Ecological groups and isotopic niches of earthworms. *Applied Soil Ecology* (under review).
- Hu, J., Zhao, H., Wang, Y., Yin, Z., Kang, Y., 2020. The bacterial community structures in response to the gut passage of earthworm (*Eisenia fetida*) feeding on cow dung and domestic sludge: Illumina high-throughput sequencing-based data analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 190, 110149.
- Huang, B., Long, J., Li, J., Ai, Y., 2021. Effects of antimony contamination on bioaccumulation and gut bacterial community of earthworm *Eisenia fetida*. *Journal of Hazardous Materials* 416, 126110.
- Huang, K., Guan, M., Chen, J., Xu, J., Xia, H., Li, Y., 2022. Biochars modify the degradation pathways of dewatered sludge by regulating active microorganisms during gut digestion of earthworms. *Science of The Total Environment* 828, 154496.
- Khomyakov, N., Kharin, S., Nechitailo, T.Y., Golyshin, P., Kurakov, A., Byzov, B., Zvyagintsev, D., 2007. Reaction of microorganisms to the digestive fluid of earthworms. *Microbiology* 76, 45-54.
- Knowles, M.E., Ross, D.S., Görres, J.H., 2016. Effect of the endogeic earthworm *Aporrectodea tuberculata* on aggregation and carbon redistribution in uninvaded forest soil columns. *Soil Biology and Biochemistry* 100, 192-200.
- Kodama, N., Kimura, T., Yonemura, S., Kaneda, S., Ohashi, M., Ikeno, H., 2014. Automated Analysis of Two-Dimensional Positions and Body Lengths of Earthworms (Oligochaeta); MimizeTrack. *PLoS ONE* 9, e97986.
- Korn-Wendisch, F., Kutzner, H., 1992. The family Streptomycetaceae. *The Prokaryotes*, 921-995.
- Korobushkin, D.I., Gongalsky, K.B., Tiunov, A.V., 2014. Isotopic niche ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values) of soil macrofauna in temperate forests. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 28, 1303-1311.
- Kozlovskaya, L., Zhdannikova, E., 1961. The combined activity of earthworms and the microflora in forest soils. *Doklady Akademii Nauk, SSSR* 139, 574-576.
- Krishnaswamy, V.G., Jaffar, M.F., Sridharan, R., Ganesh, S., Kalidas, S., Palanisamy, V., Mani, K., 2021. Effect of chlorpyrifos on the earthworm *Eudrilus euginae* and their gut microbiome by toxicological and metagenomic analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37, 1-12.

- 
- Lüderitz, O., Freudenberg, M.A., Galanos, C., Lehmann, V., Rietschel, E.T., Shaw, D.H., 1982. Lipopolysaccharides of gram-negative bacteria, Current topics in membranes and transport. Elsevier, pp. 79-151.
- Langmaid, K., 1964. Some effects of earthworm invasion in virgin podzols. *Canadian Journal of Soil Science* 44, 34-37.
- Larsen, T., Pollierer, M.M., Holmstrup, M., D'Annibale, A., Maraldo, K., Andersen, N., Eriksen, J., 2016. Substantial nutritional contribution of bacterial amino acids to earthworms and enchytraeids: A case study from organic grasslands. *Soil Biology and Biochemistry* 99, 21-27.
- Lavelle, P., 1981. *Stratégies de reproduction chez les vers de terre*.
- Lavelle, P., Spain, A., 2002. *Soil ecology*. Springer Science & Business Media.
- Leff, J.W., Jones, S.E., Prober, S.M., Barberán, A., Borer, E.T., Firn, J.L., Harpole, W.S., Hobbie, S.E., Hofmockel, K.S., Knops, J.M., 2015. Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 10967-10972.
- Li, H., Yang, X.-R., Wang, J., Zhou, G.-W., Zhang, Y.-S., Lassen, S.B., Zhu, Y.-G., Su, J.-Q., 2021. Earthworm gut: An overlooked niche for anaerobic ammonium oxidation in agricultural soil. *Science of The Total Environment* 752, 141874.
- Li, Z., Scheunemann, N., Potapov, A.M., Shi, L., Pausch, J., Scheu, S., Pollierer, M.M., 2020. Incorporation of root-derived carbon into soil microarthropods varies between cropping systems. *Biology and Fertility of Soils* 56, 839-851.
- Liu, D., Lian, B., Wu, C., Guo, P., 2018. A comparative study of gut microbiota profiles of earthworms fed in three different substrates. *Symbiosis* 74, 21-29.
- Lubbers, I.M., Van Groenigen, K.J., Fonte, S.J., Six, J., Brussaard, L., Van Groenigen, J.W., 2013. Greenhouse-gas emissions from soils increased by earthworms. *Nature Climate Change* 3, 187-194.
- Ma, L., Xie, Y., Han, Z., Giesy, J.P., Zhang, X., 2017. Responses of earthworms and microbial communities in their guts to Triclosan. *Chemosphere* 168, 1194-1202.
- Maraun, M., Erdmann, G., Fischer, B., Pollierer, M., Norton, R., Schneider, K., Scheu, S., 2011. Stable isotopes revisited: their use and limits for oribatid mite trophic ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 877-882.

- 
- Martin, A., 1991. Short-and long-term effects of the endogeic earthworm *Millsonia anomala* (Omodeo)(Megascolecidae, Oligochaeta) of tropical savannas, on soil organic matter. *Biology and Fertility of Soils* 11, 234-238.
- Martin, A., Lavelle, P., 1992. Effect of soil organic matter quality on its assimilation by *Millsonia anomala*, a tropical geophagous earthworm. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 1535-1538.
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8, e61217.
- Melody, C., Griffiths, B., Dyckmans, J., Schmidt, O., 2016. Stable isotope analysis($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of soil nematodes from four feeding groups. *PeerJ* 4, e2372.
- Merino-Trigo, A., Sampedro, L., Rodríguez-Berrocal, F.J., Mato, S., de la Cadena, M.a.P., 1999. Activity and partial characterisation of xylanolytic enzymes in the earthworm *Eisenia andrei* fed on organic wastes. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1735-1740.
- Miles, H., 1963. The occurrence of acephaline gregarines in some British earthworms. *Arch. Protistenk* 106, 575-582.
- Minagawa, M., Wada, E., 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica et cosmochimica acta* 48, 1135-1140.
- Normand, P., Queiroux, C., Tisa, L.S., Benson, D.R., Rouy, Z., Cruveiller, S., Médigue, C., 2007. Exploring the genomes of *Frankia*. *Physiologia Plantarum* 130, 331-343.
- Nowak, E., 1975. Population density of earthworms and some elements of their production in several grassland environments.
- O'brien, B., Stout, J., 1978. Movement and turnover of soil organic matter as indicated by carbon isotope measurements. *Soil Biology and Biochemistry* 10, 309-317.
- Palm, J., van Schaik, N.L.M., Schröder, B., 2013. Modelling distribution patterns of anecic, epigeic and endogeic earthworms at catchment-scale in agro-ecosystems. *Pedobiologia* 56, 23-31.
- Parle, J., 1963. Micro-organisms in the intestines of earthworms. *Microbiology* 31, 1-11.
- Parmelee, R.W., Beare, M.H., Cheng, W., Hendrix, P.F., Rider, S.J., Crossley, D.A., Coleman, D.C., 1990. Earthworms and enchytraeids in conventional and no-tillage agroecosystems: A biocide approach to assess their role in organic matter breakdown. *Biology and Fertility of Soils* 10, 1-10.

- 
- Pass, D.A., Morgan, A.J., Read, D.S., Field, D., Weightman, A.J., Kille, P., 2015. The effect of anthropogenic arsenic contamination on the earthworm microbiome. *Environmental Microbiology* 17, 1884-1896.
- Pechenik, J.A., 2006. *Biology the Invertebrates*. McGraw–Hill Companies.
- Perel, T., 1977. Differences in lumbricid organization connected with ecological properties. *Ecological Bulletins*, 56-63.
- Potapov, A.A., Semenina, E.E., Korotkevich, A.Y., Kuznetsova, N.A., Tiunov, A.V., 2016. Connecting taxonomy and ecology: Trophic niches of collembolans as related to taxonomic identity and life forms. *Soil Biology and Biochemistry* 101, 20-31.
- Potapov, A.M., Beaulieu, F., Birkhofer, K., Bluhm, S.L., Degtyarev, M.I., Devetter, M., Goncharov, A.A., Gongalsky, K.B., Klärner, B., Korobushkin, D.I., Liebke, D.F., Maraun, M., Mc Donnell, R.J., Pollierer, M.M., Schaefer, I., Shrubovych, J., Semenyuk, I.I., Sendra, A., Tuma, J., Tůmová, M., Vassilieva, A.B., Chen, T.W., Geisen, S., Schmidt, O., Tiunov, A.V., Scheu, S., 2022. Feeding habits and multifunctional classification of soil-associated consumers from protists to vertebrates. *Biological Reviews*.
- Potapov, A.M., Semenyuk, I.I., Tiunov, A.V., 2014. Seasonal and age-related changes in the stable isotope composition ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) of millipedes and collembolans in a temperate forest soil. *Pedobiologia* 57, 215-222.
- Price-Christenson, G.J., Johnston, M.R., Herrick, B.M., Yannarell, A.C., 2020. Influence of invasive earthworms (*Amyntas* spp.) on Wisconsin forest soil microbial communities and soil chemistry. *Soil Biology and Biochemistry* 149, 107955.
- R.Core.Team, 2022. TEAM, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Online: <https://www.r-project.org>.
- Ravindran, B., Contreras-Ramos, S., Sekaran, G., 2015. Changes in earthworm gut associated enzymes and microbial diversity on the treatment of fermented tannery waste using epigeic earthworm *Eudrilus eugeniae*. *Ecological Engineering* 74, 394-401.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F., 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, e2584.
- Rosenberg, E., 2014. The family chitinophagaceae. *The prokaryotes*, 493-495.

- 
- Sabine, J., 1978. The nutritive value of earthworm meal, Proceedings of Conference on Utilization of Soil Organisms in Sludge Management, Syracuse, NY/ed. by R. Kalamazoo. MI, pp. 122-130.
- Sampedro, L., Jeannotte, R., Whalen, J.K., 2006. Trophic transfer of fatty acids from gut microbiota to the earthworm *Lumbricus terrestris* L. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 2188-2198.
- Sapkota, R., Santos, S., Farias, P., Krogh, P.H., Winding, A., 2020. Insights into the earthworm gut multi-kingdom microbial communities. *Science of The Total Environment* 727, 138301.
- Schlatter, D.C., Baugher, C.M., Kahl, K., Huggins, D.R., Johnson-Maynard, J.L., Paulitz, T.C., 2019. Bacterial communities of soil and earthworm casts of native Palouse Prairie remnants and no-till wheat cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry* 139, 107625.
- Schmidt, O., 1999. Intrapopulation variation in carbon and nitrogen stable isotope ratios in the earthworm *Aporrectodea longa*. *Ecological Research* 14, 317-328.
- Sokol, N.W., Slessarev, E., Marschmann, G.L., Nicolas, A., Blazewicz, S.J., Brodie, E.L., Firestone, M.K., Foley, M.M., Hestrin, R., Hungate, B.A., 2022. Life and death in the soil microbiome: How ecological processes influence biogeochemistry. *Nature Reviews Microbiology*, 1-16.
- Svensson, B., Boström, U., Klemetson, L., 1986. Potential for higher rates of denitrification in earthworm casts than in the surrounding soil. *Biology and Fertility of Soils* 2, 147-149.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research* 25, 4876-4882.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., Van Sinderen, D., 2007. Genomics of *Actinobacteria* : Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71, 495-548.
- Wüst, P.K., Horn, M.A., Drake, H.L., 2011. Clostridiaceae and Enterobacteriaceae as active fermenters in earthworm gut content. *The ISME Journal* 5, 92-106.
- Wang, H.-T., Zhu, D., Li, G., Zheng, F., Ding, J., O'Connor, P.J., Zhu, Y.-G., Xue, X.-M., 2019. Effects of arsenic on gut microbiota and its biotransformation genes in

- 
- earthworm *Metaphire sieboldi*. *Environmental Science & Technology* 53, 3841-3849.
- Wang, N., Wang, W., Jiang, Y., Dai, W., Li, P., Yao, D., Wang, J., Shi, Y., Cui, Z., Cao, H., Dong, Y., Wang, H., 2021. Variations in bacterial taxonomic profiles and potential functions in response to the gut transit of earthworms (*Eisenia fetida*) feeding on cow manure. *Science of The Total Environment* 787, 147392.
- Wickham, H., 2016. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. springer.
- Wilschut, R.A., van der Putten, W.H., Garbeva, P., Harkes, P., Konings, W., Kulkarni, P., Martens, H., Geisen, S., 2019. Root traits and belowground herbivores relate to plant–soil feedback variation among congeners. *Nature Communications* 10, 1-9.
- Wüst, P.K., Horn, M.A., Drake, H.L., 2009. In situ hydrogen and nitrous oxide as indicators of concomitant fermentation and denitrification in the alimentary canal of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1852-1859.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R., Rosselló-Móra, R., 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology* 12, 635-645.
- Yeates, G.W., Bongers, T., De Goede, R.G., Freckman, D.W., Georgieva, S., 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera—an outline for soil ecologists. *Journal of nematology* 25, 315.
- Zeiger, E., Zhu, J., 1998. Role of zeaxanthin in blue light photoreception and the modulation of light-CO₂ interactions in guard cells. *Journal of Experimental Botany*, 433-442.
- Zhu, G., Du, R., Du, D., Qian, J., Ye, M., 2021. Keystone taxa shared between earthworm gut and soil indigenous microbial communities collaboratively resist chlordane stress. *Environmental Pollution* 283, 117095.

柒、圖與表



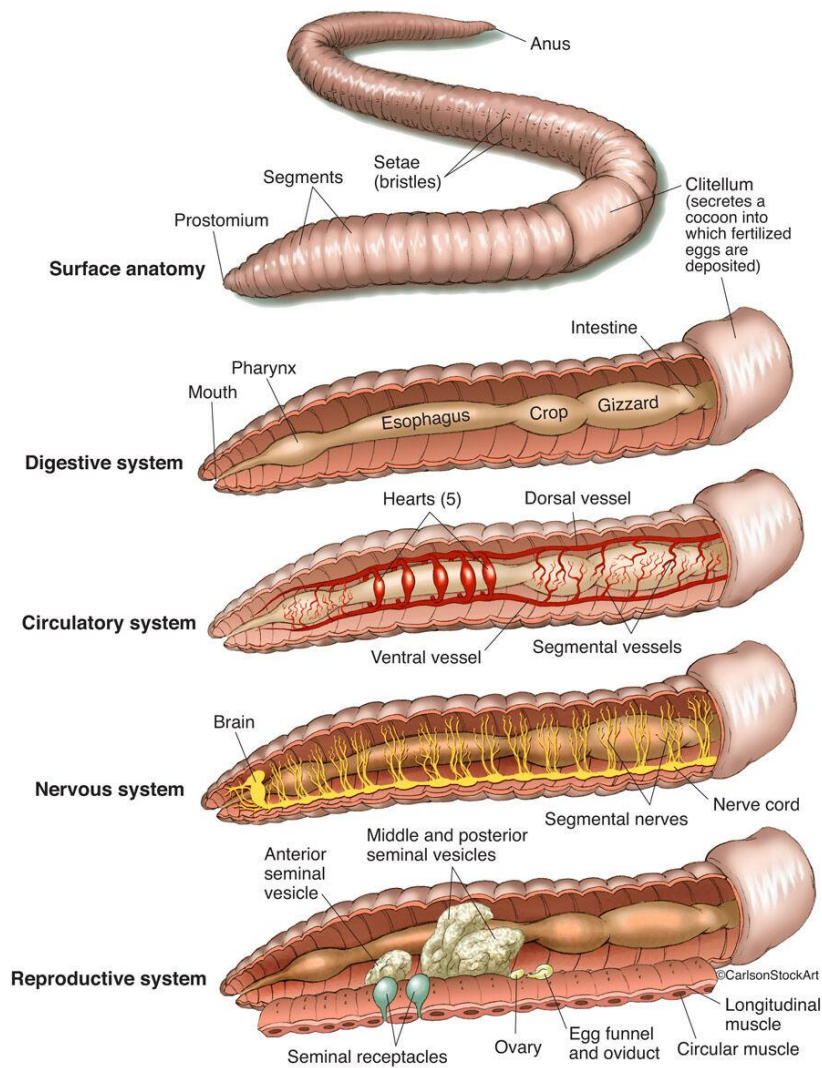


圖 1 蚯蚓內部形態構造示意圖

蚯蚓的消化道構造可分為口(mouth)、咽(pharynx)、食道(esophagus)、嗉囊(crop)、砂囊(gizzard)、腸道(intestine)、肛門(anus)

圖片來源：<https://www.carlsonstockart.com/photo/earthworm-annelid-segmented-worm-anatomy-structure-illustration/>

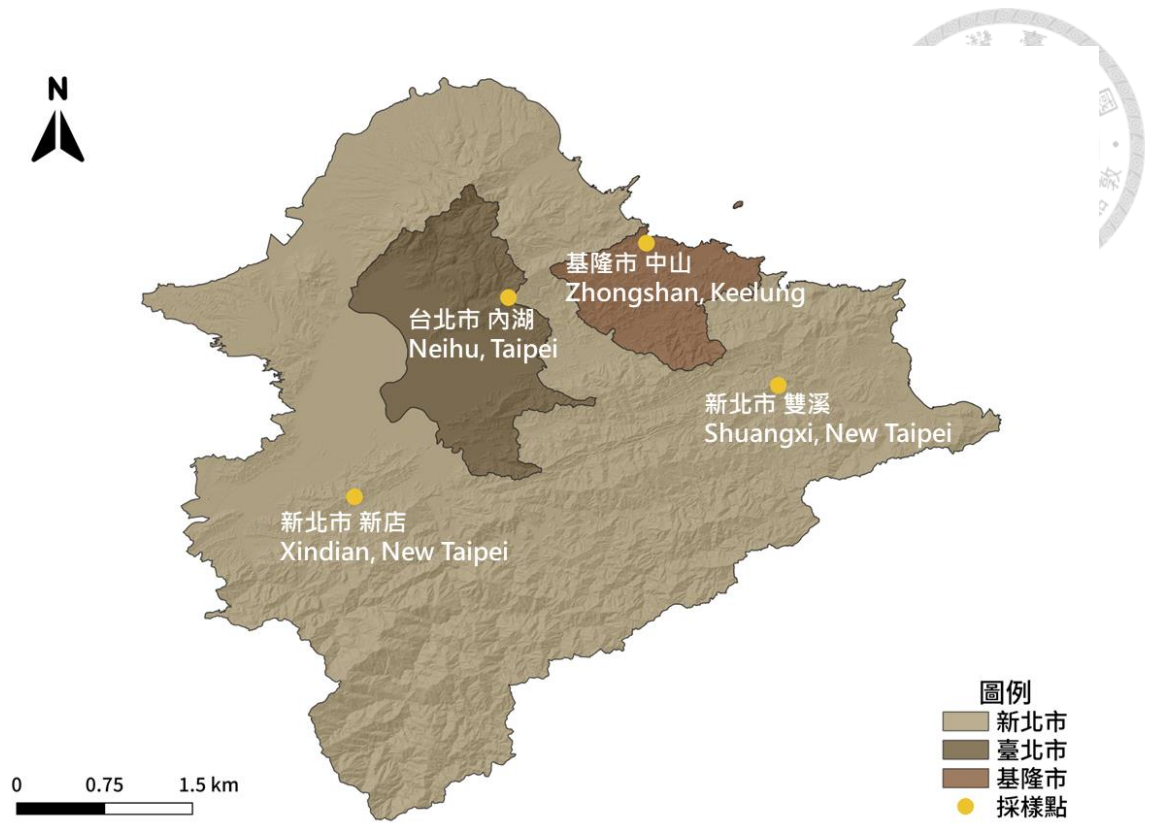


圖 2 北部次生林樣區位置

共四個樣區位於北台灣低海拔次生林，樣區選擇排除人造林與竹林。

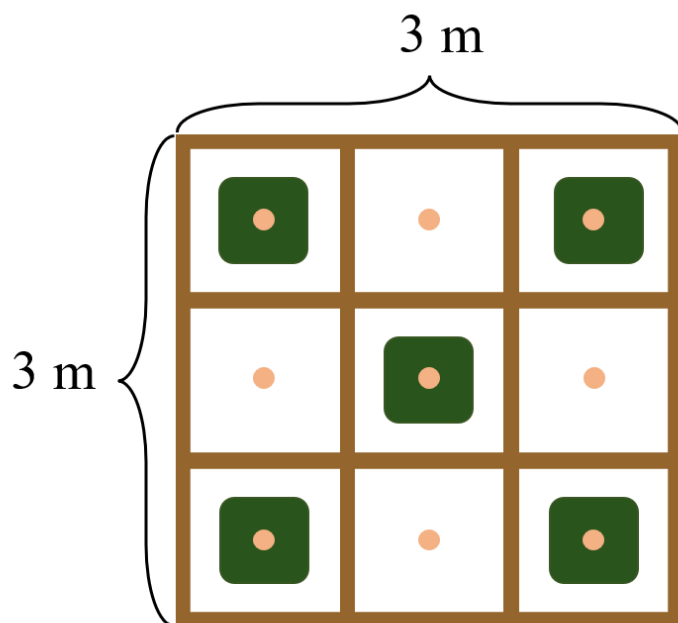
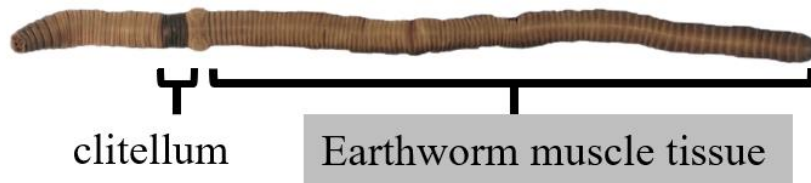


圖 3 樣區內標準化採樣示意圖

樣區為邊長三公尺的正方形，並平均劃分為九個子樣區。依圖示隨機取九個土柱(黃色實心圓， $\varnothing = 2\text{cm}$)、五個落葉框(綠色正方形，邊長 50 公分)及挖掘樣區內所有蚯蚓。每個土柱再分別取樣表層土壤(0-5cm)與底層土壤(15-20cm)。

(A)



(B)

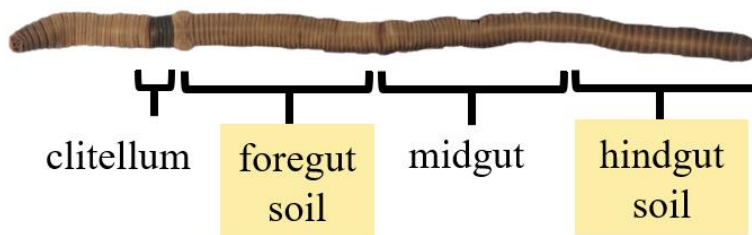


圖 4 用於分析穩定同位素與次世代定序分析之蚯蚓樣本示意圖

(A) 蚯蚓肌肉組織用於穩定同位素分析；(B) 蚯蚓前、後腸道內土壤用於次世代定序分析。以環帶為起始點至尾端將蚯蚓平均劃分為三個區段，並依序定義為前腸、中腸、後腸。解剖並取其前、後腸道內土壤為次世代定序分析使用；環帶之前的蚯蚓頭部區段放置於 95% 酒精中作為後續鑑定物種所用；接著將頭部區段除外的樣本清除血管、神經、腸道等器官，留下蚯蚓體壁肌肉組織作為穩定同位素所用。

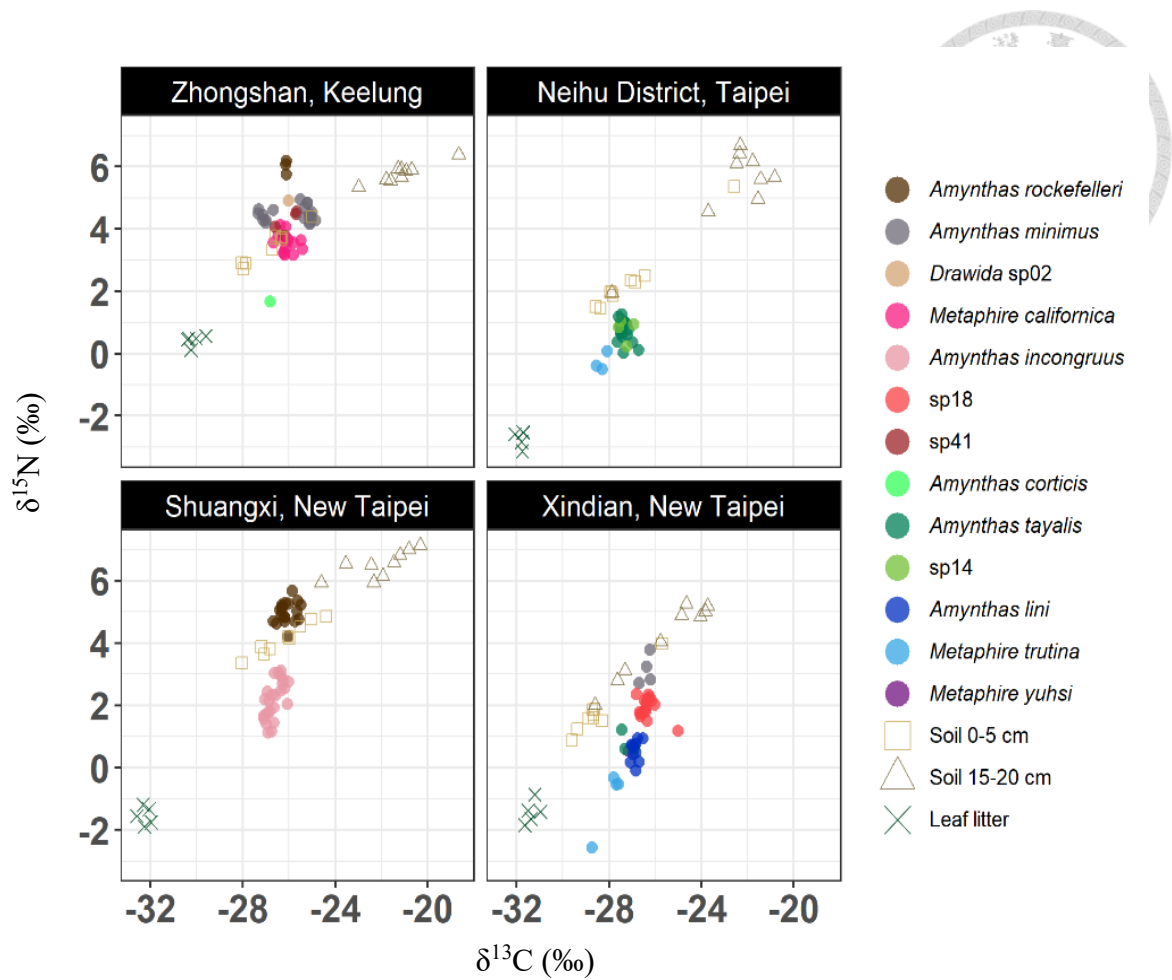


圖 5 蚯蚓、土壤、落葉之 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 穩定同位素數值

不同的顏色與符號分別表示不同蚯蚓物種、0-5 cm 土壤、15-20 cm 土壤、落葉。各地區 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 呈現相似的趨勢，數值由低至高依序為落葉、0-5 cm 土壤、15-20 cm 土壤。各地區內不同種蚯蚓間可見明顯的分群。

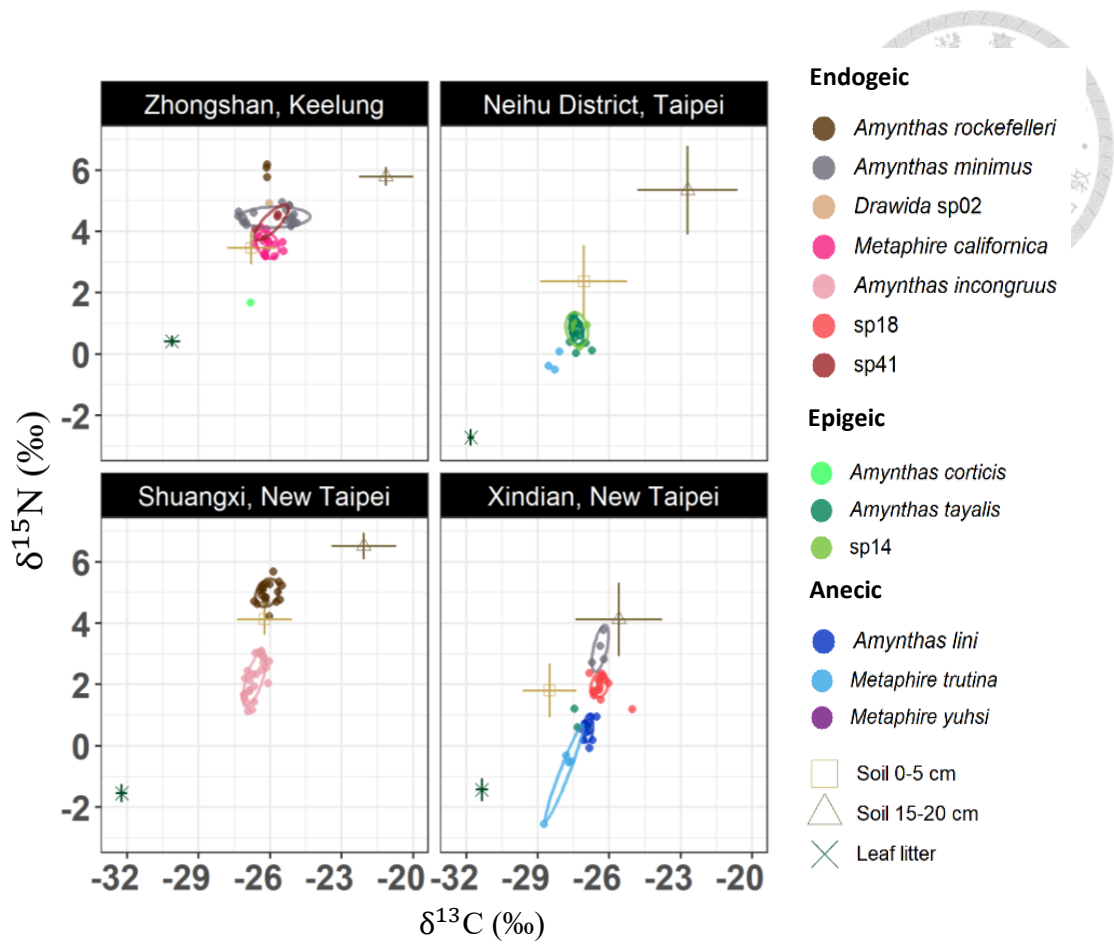


圖 6 蚯蚓、土壤、落葉之 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 穩定同位素數值

不同的顏色與符號分別表示不同蚯蚓物種、0-5 cm 土壤、15-20 cm 土壤、落葉。每個採樣地之 0-5 cm 土壤、15-20 cm 土壤、落葉分別呈現其平均值與標準差；相同樣區之同一物種蚯蚓若樣本數達四隻，則以橢圓呈現數值分布，橢圓大小為樣本中取 70% 信賴區間的範圍。

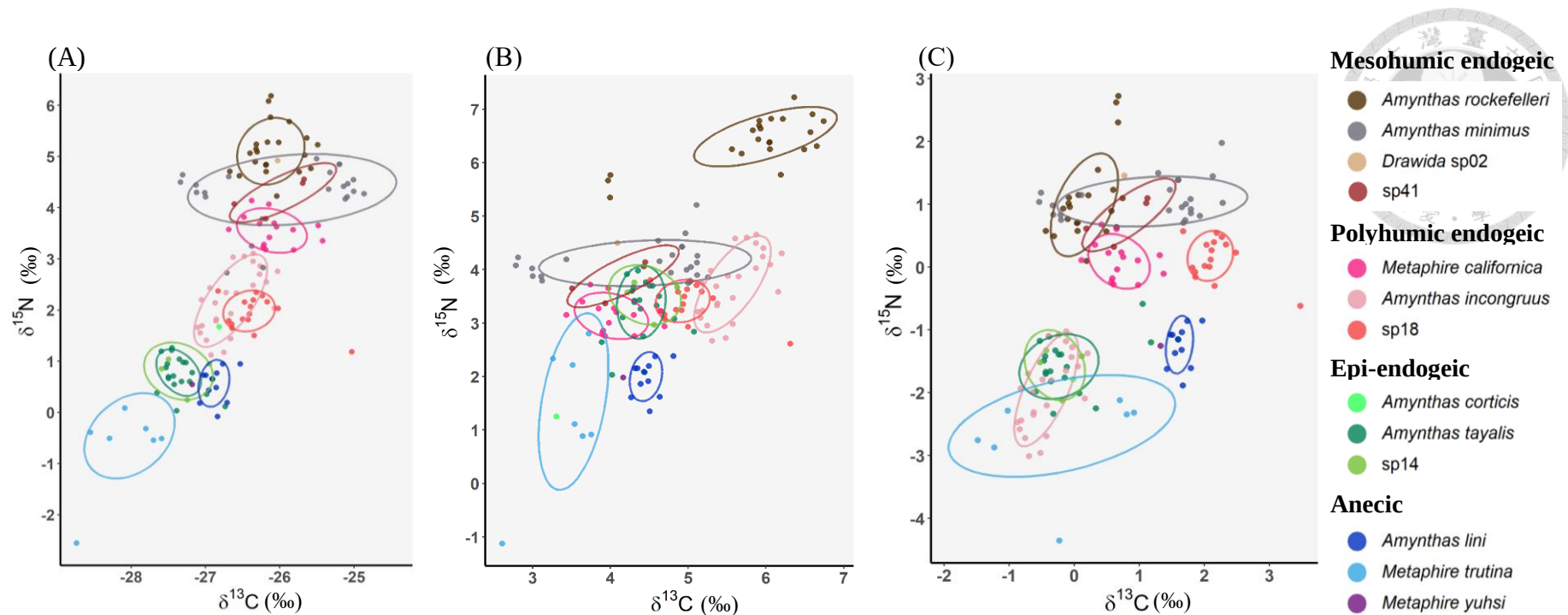


圖 7 合併四個樣區蚯蚓 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 穩定同位素數值

(A)將原數值合併作圖；(B)以落葉標準化後合併作圖；(C)以 0-5 cm 土壤進行標準化後合併作圖。同一物種蚯蚓若樣本數達四隻，則以橢圓呈現數值分布，橢圓大小為 70%信賴區間。

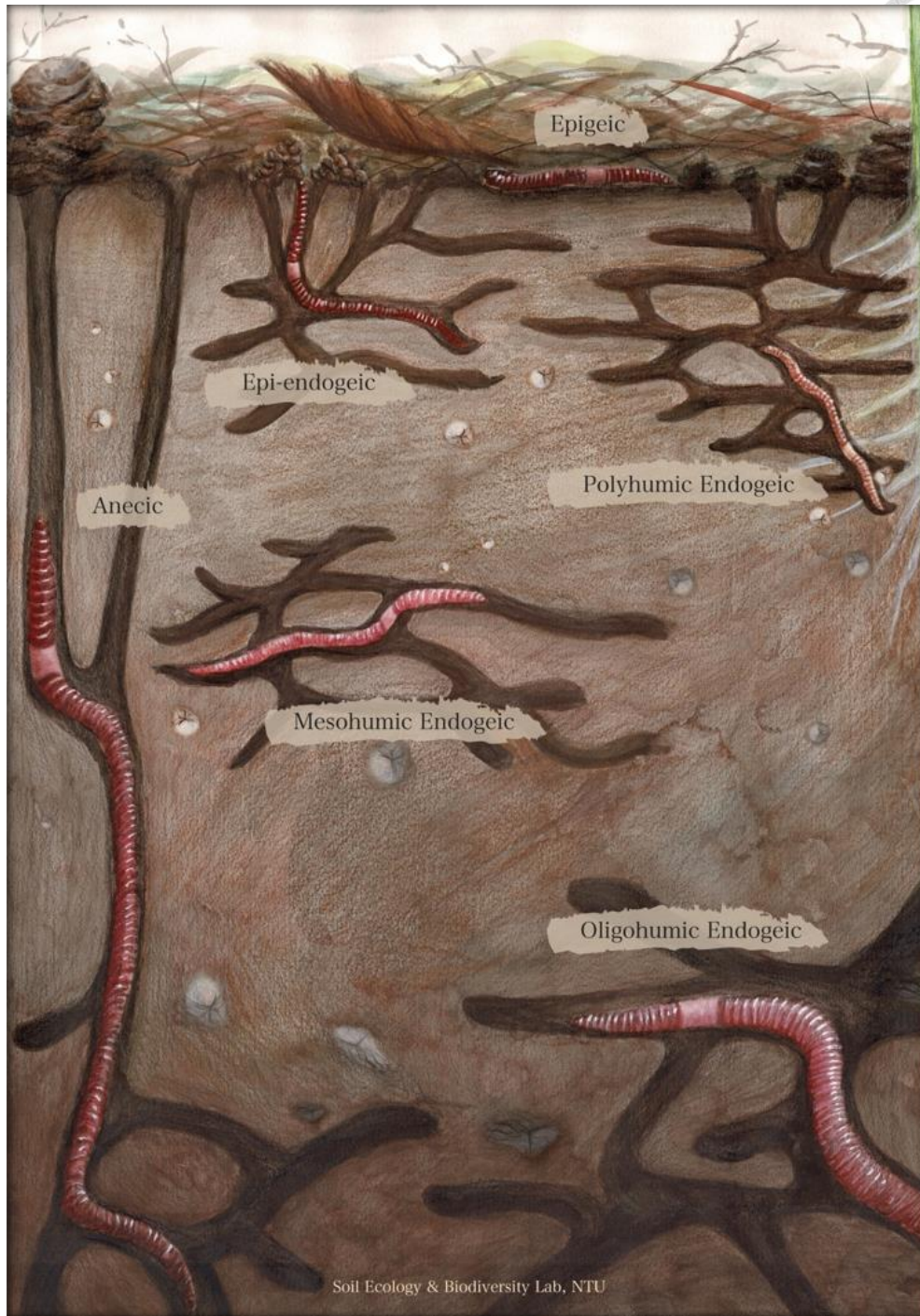


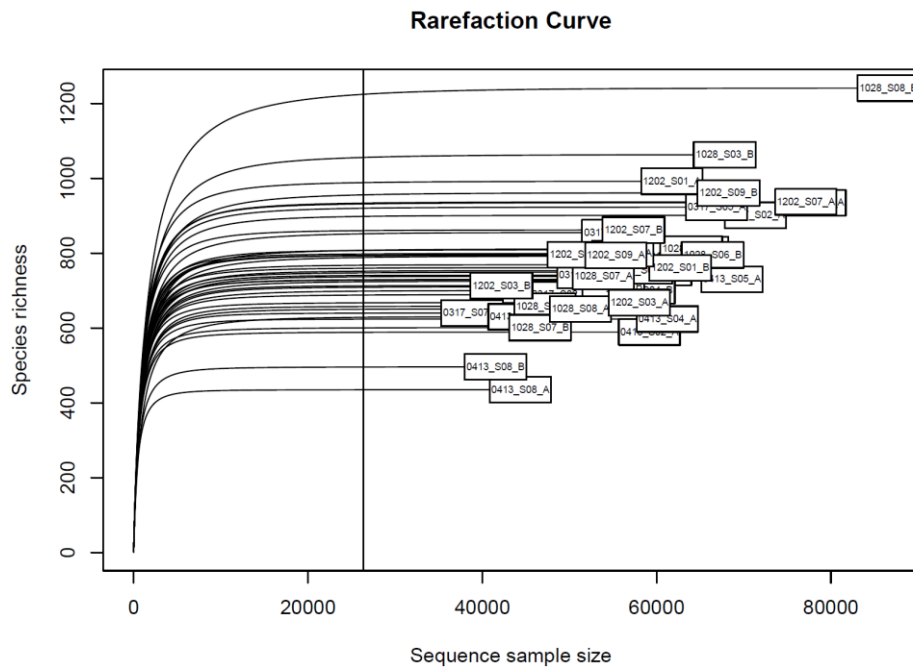
圖 8 蚯蚓生態群概念圖

蚯蚓可大略分為表層型(epigeic)、底層型(endogeic)與貫穿型(anecic)三個生態群；並可再進一步細分為六群：epigeic—取食落葉；epi-endogeic—取食落葉及表土層中的腐植質；anecic—取食地表的落葉但居住於深層土壤；底層型蚯蚓(endogeic)可更細分為三群，包含 polyhumic endogeic—取食礦物質含量較低且有機質含量較高的土壤，mesohumic endogeic—取食礦物質含量較高且有機質含量較低的土壤，以及 oligohumic endogeic—取食礦物質含量較高且有機質相當少的底層土壤。

圖片取自 Hsu et al. (2022)



(A)



(B)

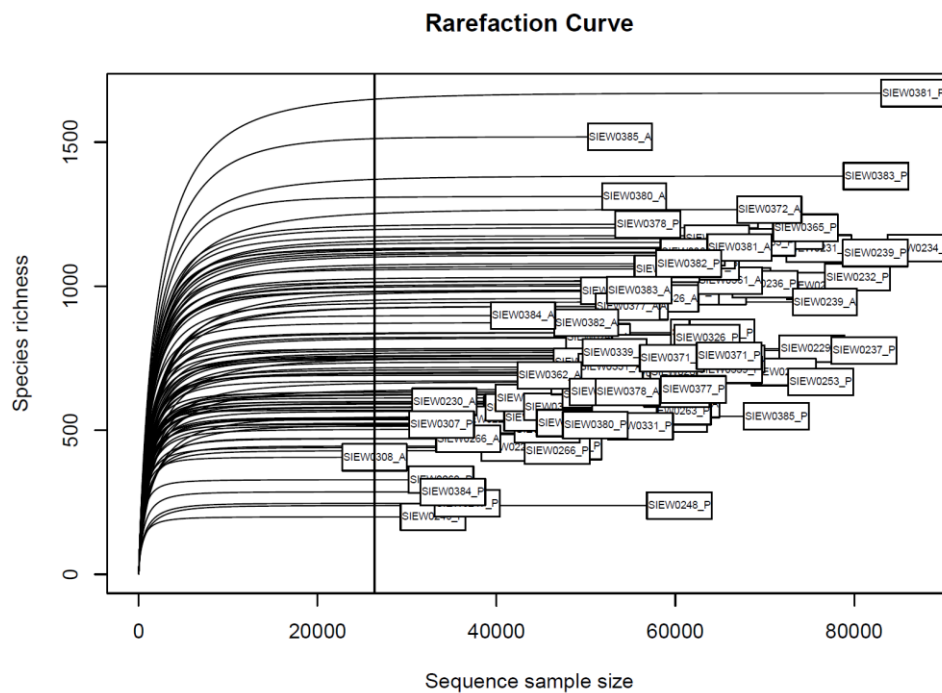


圖 9 周界土壤與蚯蚓腸道土壤菌相 ASV 稀釋曲線

(A)與(B)分別為周界土壤與蚯蚓腸道土壤菌相稀釋曲線。橫軸為定序深度，為各樣本所定序所得到的序列總量，縱軸為 ASV 物種豐富度，為各樣本所定序 ASV 種數。稀釋曲線於各樣本中趨於平緩，表示所定序到 ASV 種數趨於飽和，垂直的實線為所有樣本中序列總量最小者，對應到的橫軸為 26371，用於全部樣本之標準化。

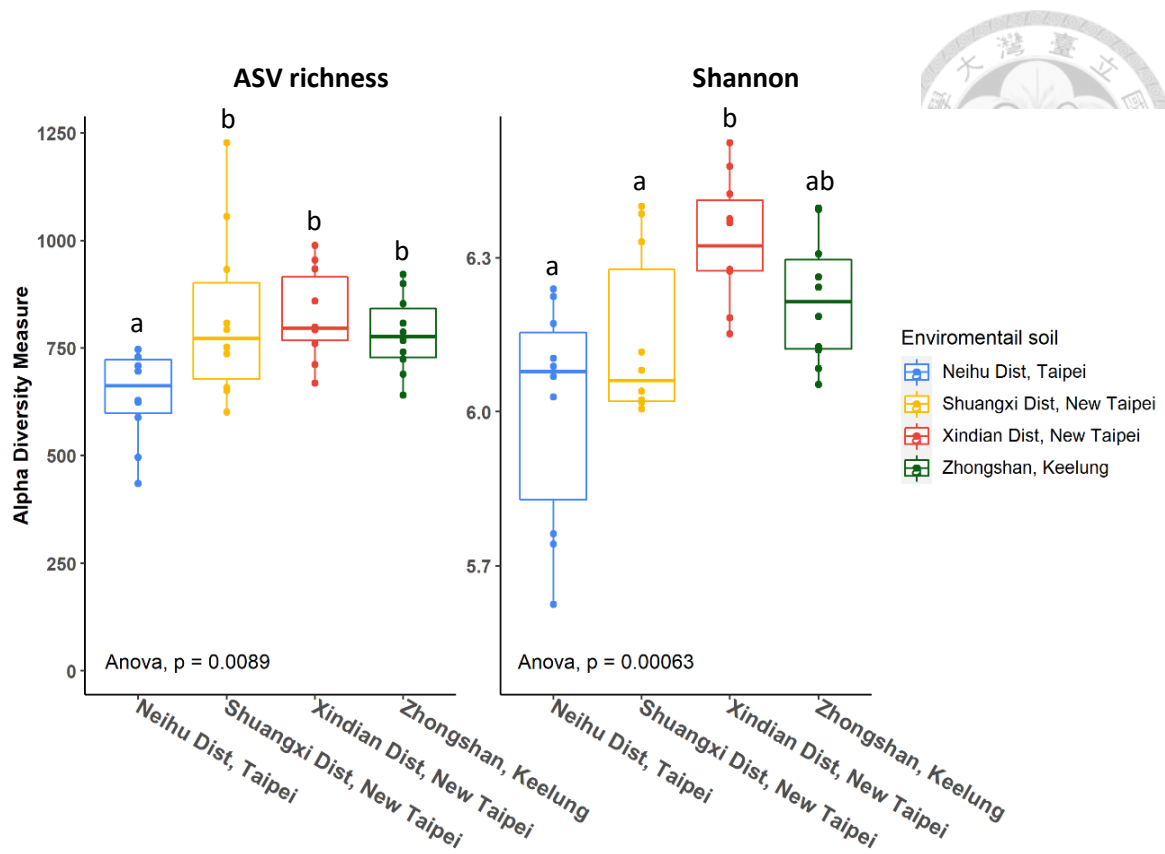


圖 10 周界土壤菌相 α 多樣性指數分析

比較四個採集樣區周界土壤菌相，分析其菌相 α 多樣性，ASV richness ($p=0.0089$) 與 Shannon 多樣性指數($p=0.00063$)皆顯示四個採集樣區周界土壤菌相具有顯著差異。內湖與其他樣區相比 ASV 種數最低，與其他三個地區具有顯著差異。Shannon 多樣性指數同時納入 ASV 物種豐富度與物種均勻度計算，在新店地區顯著高於內湖、雙溪地區。(實際值以表 6；ANOVA test 結果如表 8；Tukey HSD Test 結果如附表 9)

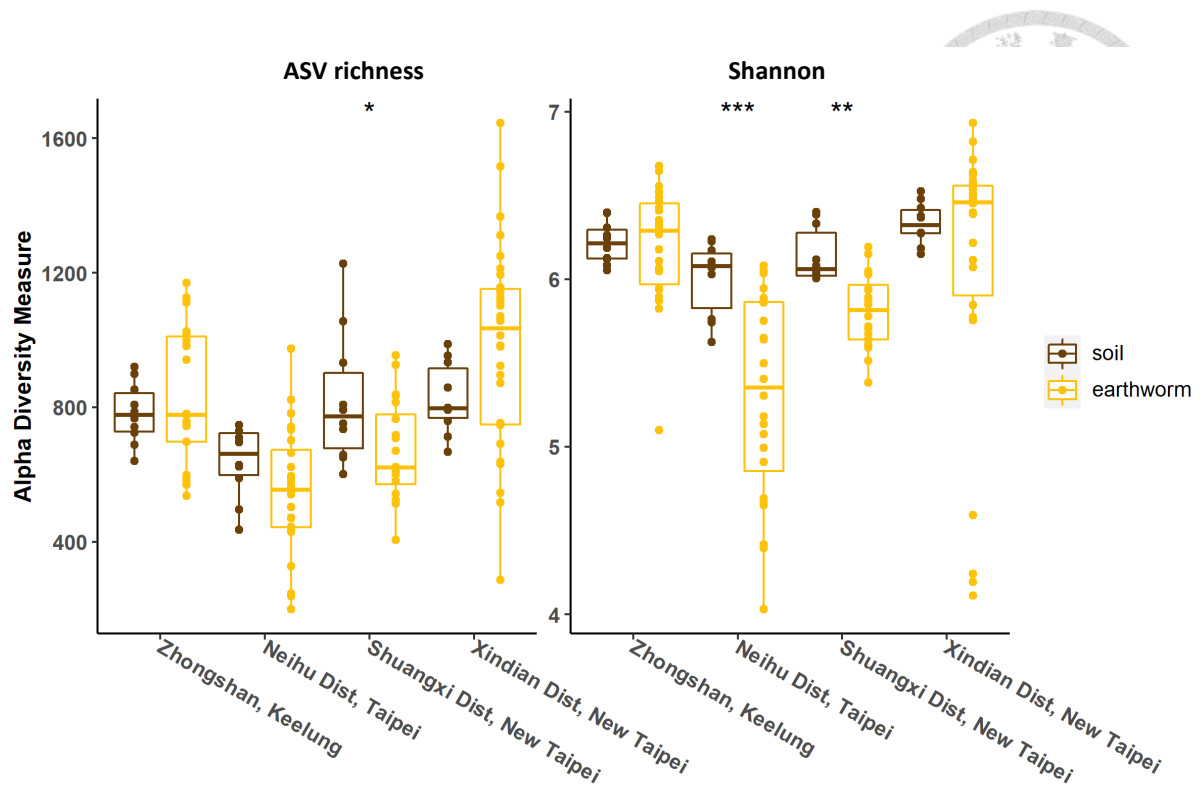


圖 11 土壤與蚯蚓腸道菌相 α 多樣性指數分析

四個樣區各自比較樣區內土壤與蚯蚓腸道菌相 α 多樣性指數。ASV richness 顯示雙溪地區土壤與蚯蚓腸道菌相中位數具有顯著差異，而其他三個地區皆無顯著差異；Shannon 多樣性指數顯示內湖、雙溪地區土壤與蚯蚓腸道菌相中位數具有顯著差異，而其他兩個地區皆無顯著差異。統計方式以 Wilcoxon Rank Sum Test 檢定之，組間差異表示 “*” 為 $p < 0.1$ ；組間差異表示 “**” 為 $p < 0.01$ ；組間差異表示 “***” 為 $p < 0.001$ 。(實際值以表 6、7；Wilcoxon rank sum test 結果如表 10)

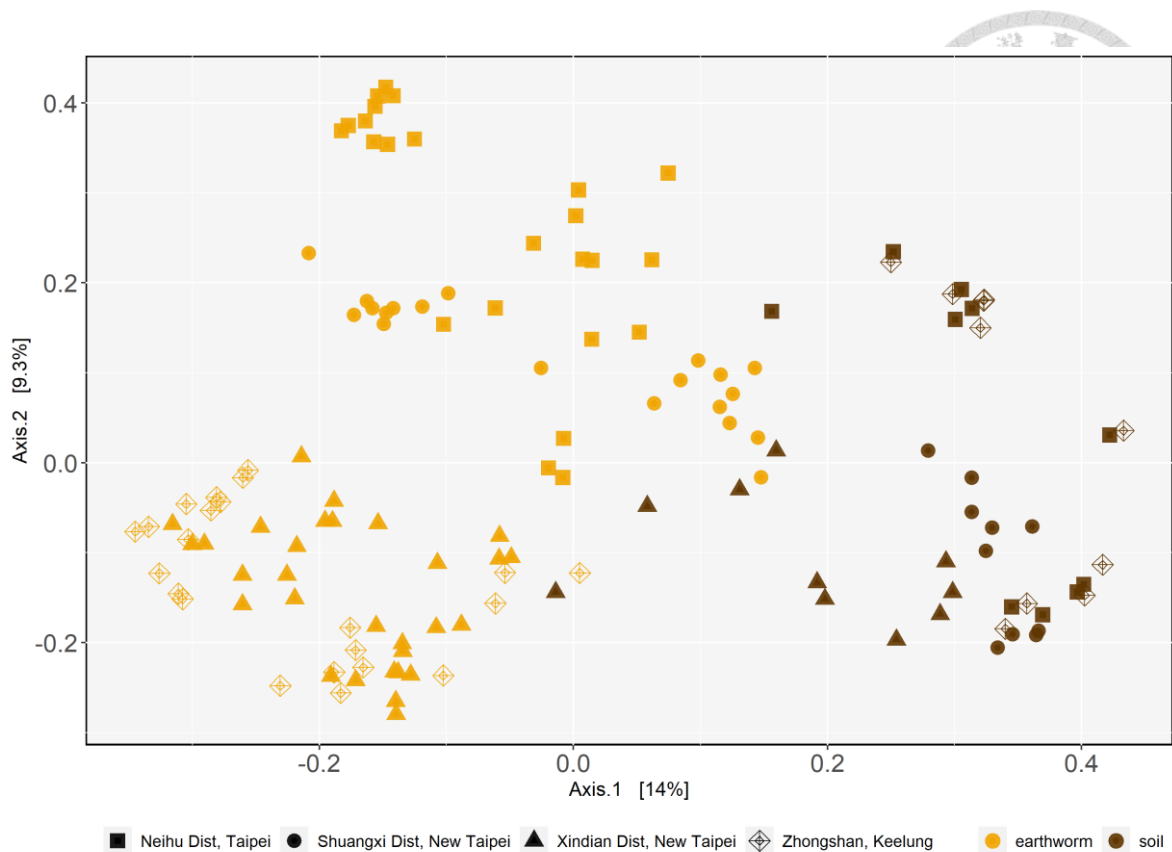


圖 12 蚯蚓腸道土壤與周界土壤之主座標分析 (PCoA)

基於 Bray-Curtis 計算樣本距離矩陣以 PCoA 分析，比較四個樣區蚯蚓腸道土壤與周界土壤之間菌相物種組成差異。不同顏色表示土壤類型，PCoA1 與 PCoA2 分別可以解釋 14%與 9.3%的變異。菌相組成組間差異(台北市內湖、新北市雙溪、新北市新店、基隆市中山)大於組內差異(ANOSIM, $R = 0.3355$ 、 $p = 0.001$)；以土壤類型而言，菌相組成組間差異(蚯蚓腸道土壤、周界土壤)大於組內差異 (ANOSIM, $R = 0.3893$ 、 $p = 0.001$)。

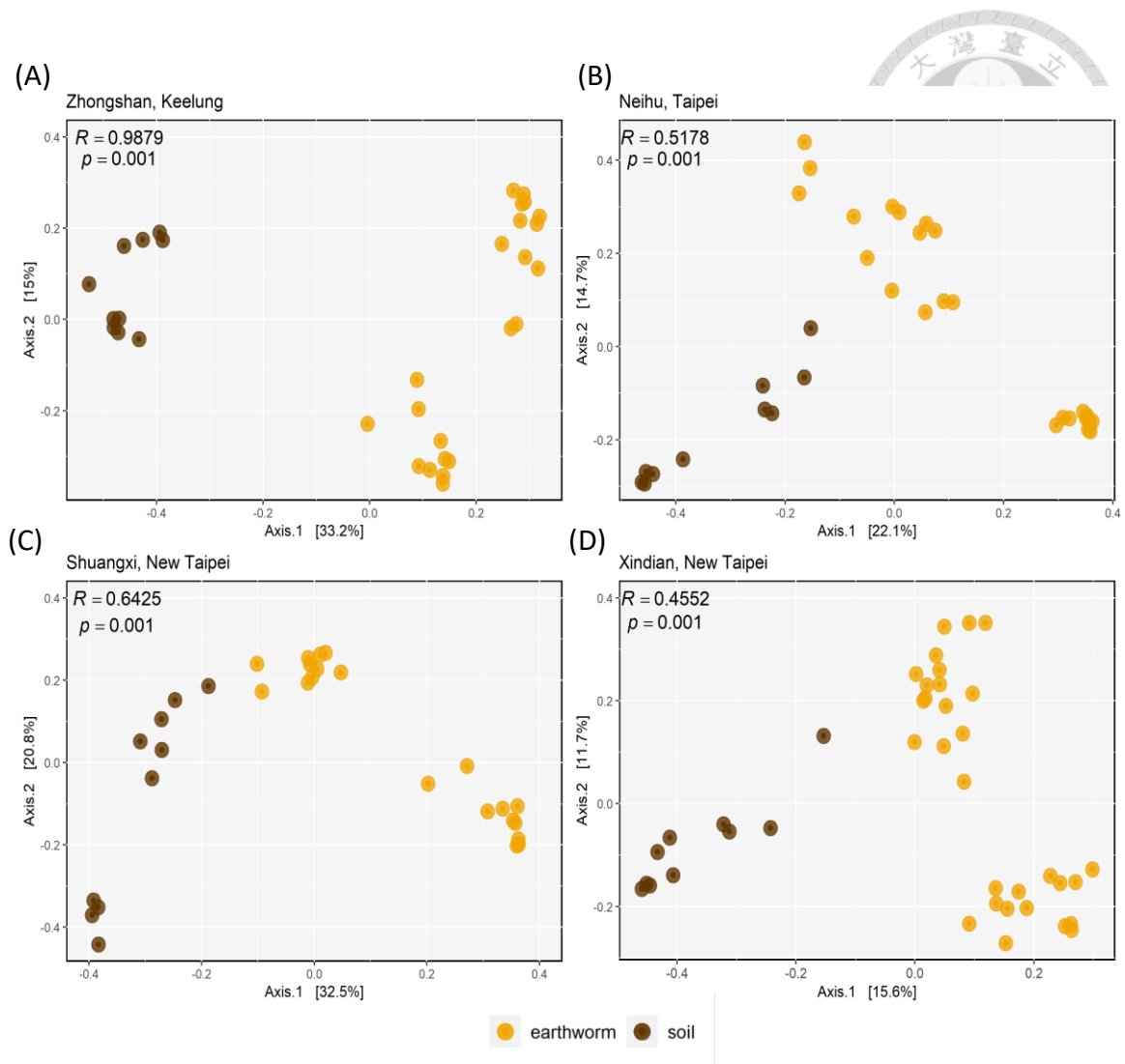


圖 13 各樣區蚯蚓腸道土壤與周界土壤之主座標分析 (PCoA)

基於 Bray-Curtis 計算樣本距離矩陣以 PCoA 分析，四個樣區各別比較蚯蚓腸道土壤與周界土壤之間菌相物種組成差異。四個地區之 PCoA1 約為 15%~33%左右，PCoA2 約為 11%~33%左右。四個地區內土壤類型而言，菌相組成組間差異(蚯蚓腸道土壤、周界土壤)顯著大於組內差異 (ANOSIM；基隆市中山： $R = 0.9879$ 、 $p = 0.001$ ，台北市內湖： $R = 0.5178$ 、 $p = 0.001$ ；新北市雙溪： $R = 0.6425$ 、 $p = 0.001$ ，新北市新店： $R = 0.4552$ 、 $p = 0.001$)。

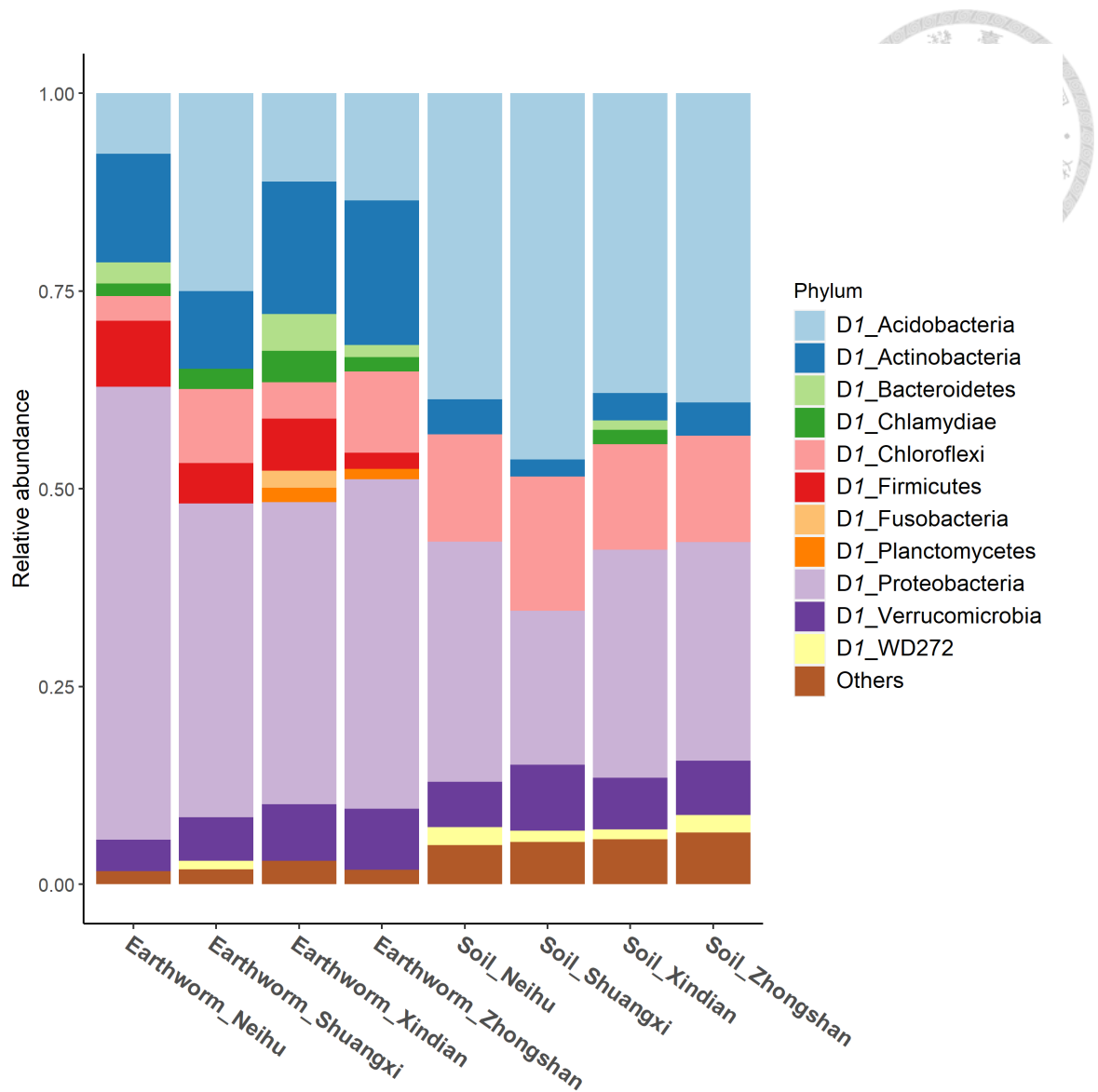


圖 14 蚯蚓腸道土壤與周界土壤優勢菌群菌門(Phylum)階層之相對豐度

圖中左側為蚯蚓腸道土，右側為周界土壤；僅列出菌門的相對豐度高於 1% 者。蚯蚓腸道的優勢菌門為 *Acidobacteria*、*Actinobacteria*、*Proteobacteria*，周界土壤的優勢菌門為 *Acidobacteria*、*Proteobacteria*、*chloroflexi*。

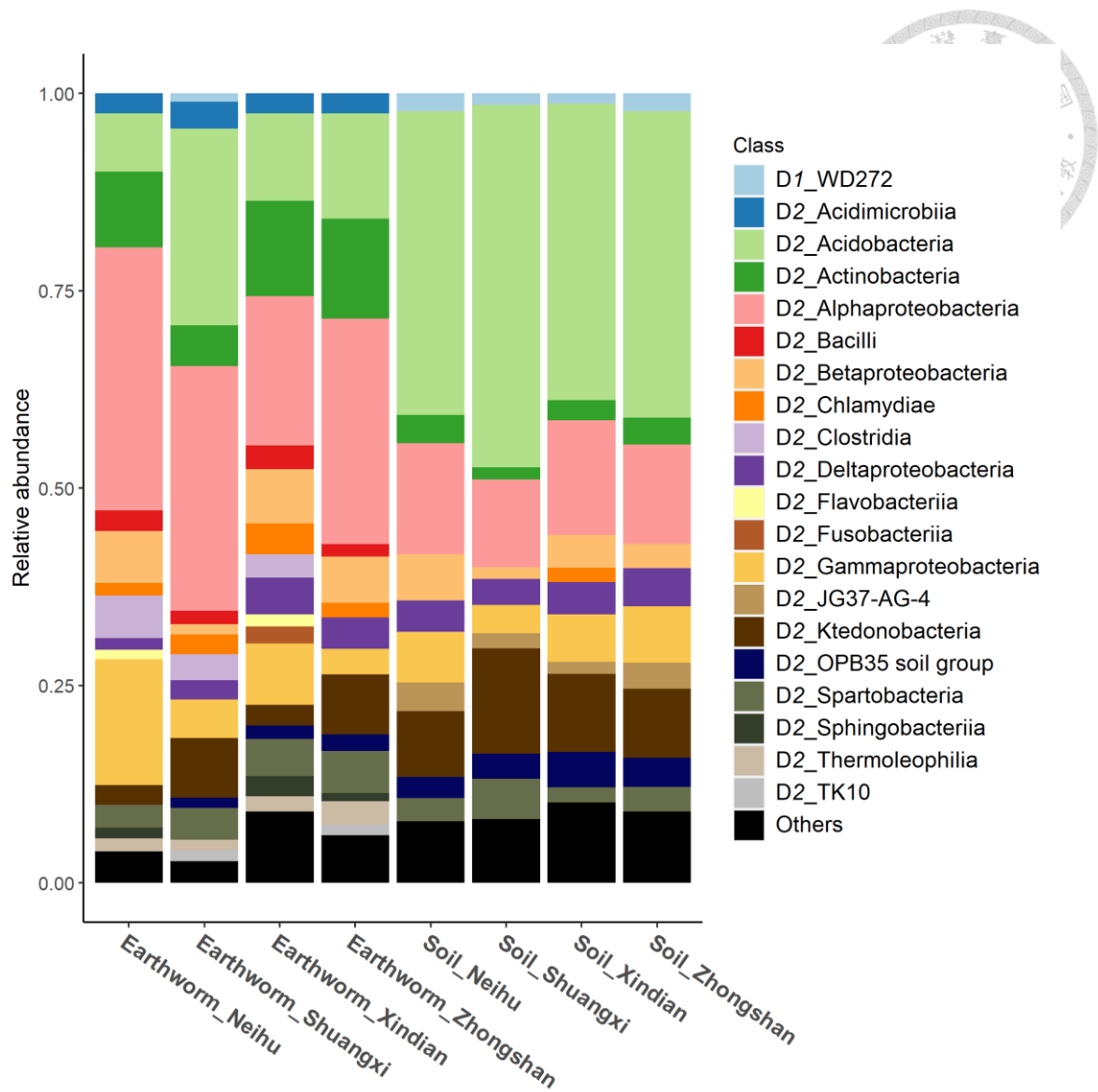


圖 15 蚯蚓腸道土壤與周界土壤優勢菌群菌綱(Class)階層之相對豐度

圖中左側為蚯蚓腸道土，右側為周界土壤；僅列出菌綱相對豐度高於 1% 者。蚯蚓腸道的優勢菌綱為 *Acidobacteria*、*Actinobacteria*、*Alphaproteobacteria*，周界土壤的優勢菌綱為 *Acidobacteria*、*Alphaproteobacteria*、*ktedonobacteria*。

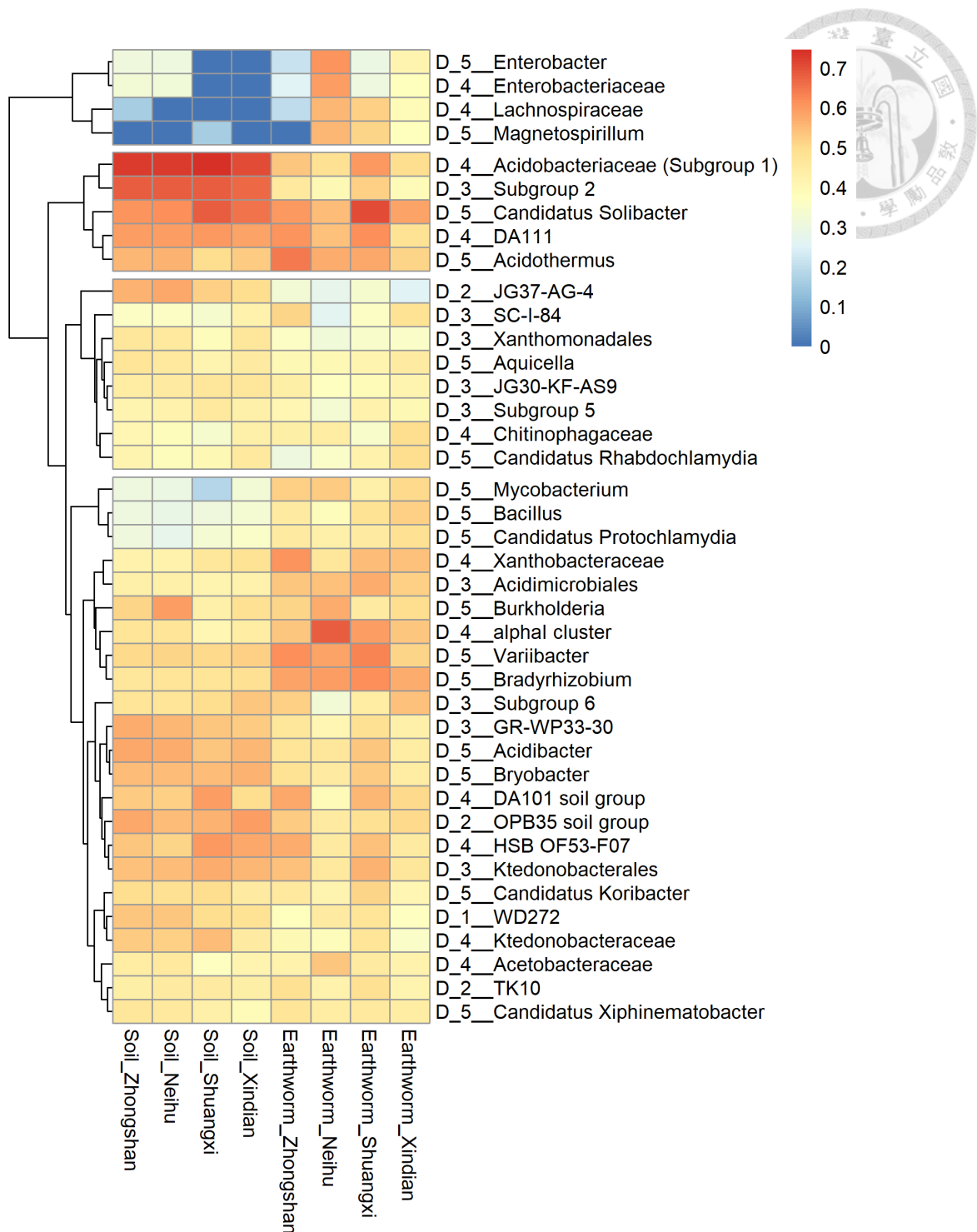


圖 16 蚯蚓腸道土壤與周界土壤菌相已知最小階層之相對豐度熱點圖

僅列出相對豐度最高的前 30 個菌群；紅色與藍色分別為相對豐度高與低，數值為各菌群相對豐度百分比取根號六次方；相似度分析以歐式距離(Euclidean distance)作為基準，以平均連結演算法進行分群(average-linkage algorithm)。

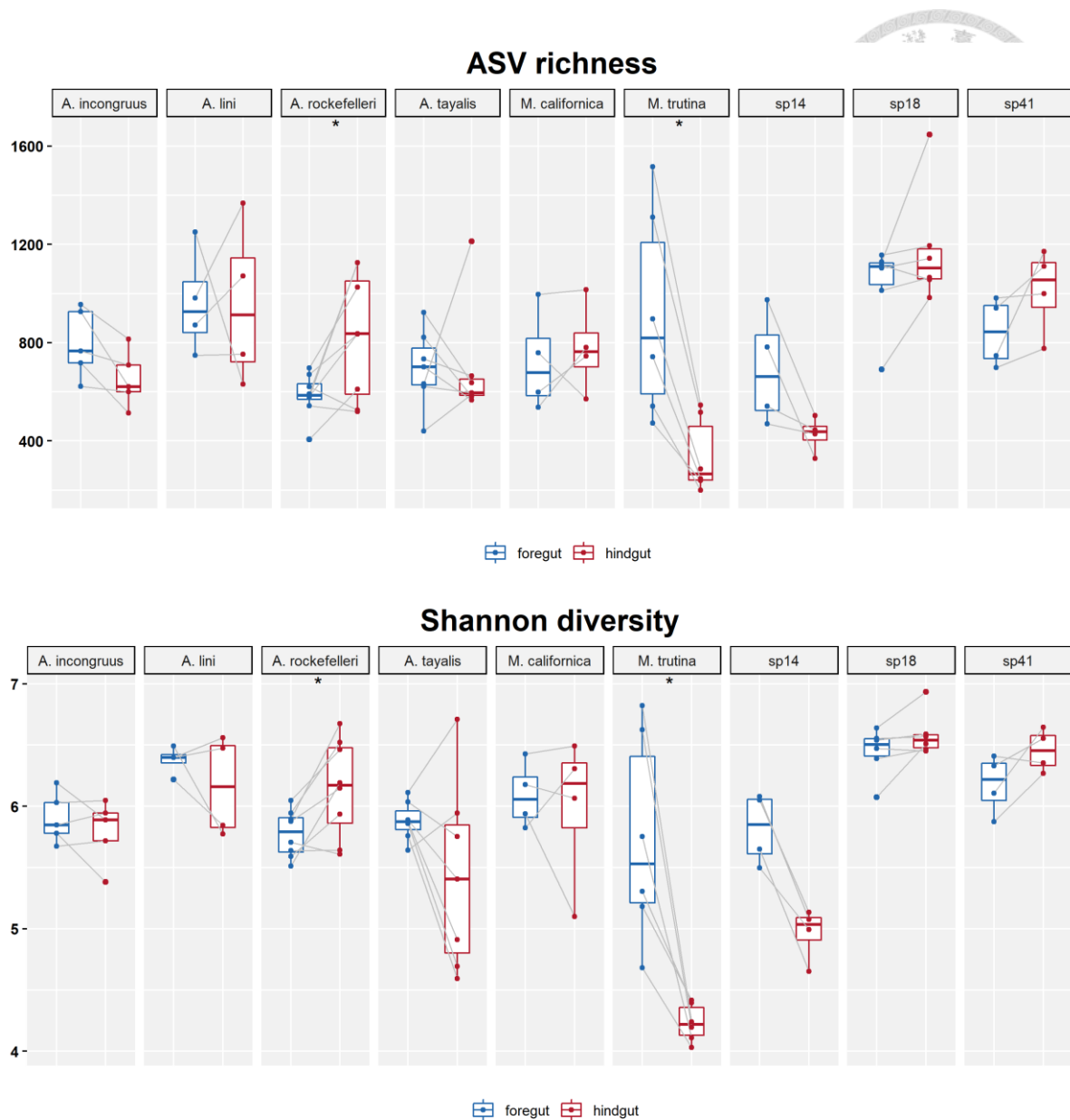


圖 17 蚯蚓腸道土壤前、後腸菌相 α 多樣性指數分析

分別針對各物種蚯蚓比較腸道土壤前、後腸菌相 α 多樣性指數，在分析的九種蚯蚓中，有兩種蚯蚓呈現統計上顯著的差異。其中洛克斐勒遠環蚓 *A. rockefelleri* 的 observed richness 與 Shannon 多樣性指數皆是後腸高於前腸(ASV richness: $p = 0.0391$; Shannon: $p = 0.0234$)；而天秤腔環蚓 *M. trutina* 其則相反，前腸高於後腸(ASV richness: $p = 0.0313$; Shannon: $p = 0.0313$)。統計方式以 Wilcoxon signed-rank test 檢定之，組間差異表示 “*” 為 $p < 0.1$ ；組間差異表示 “**” 為 $p < 0.01$ ；組間差異表示 “***” 為 $p < 0.001$ 。(實際值以表 7，Wilcoxon signed-rank test 結果如表 11)

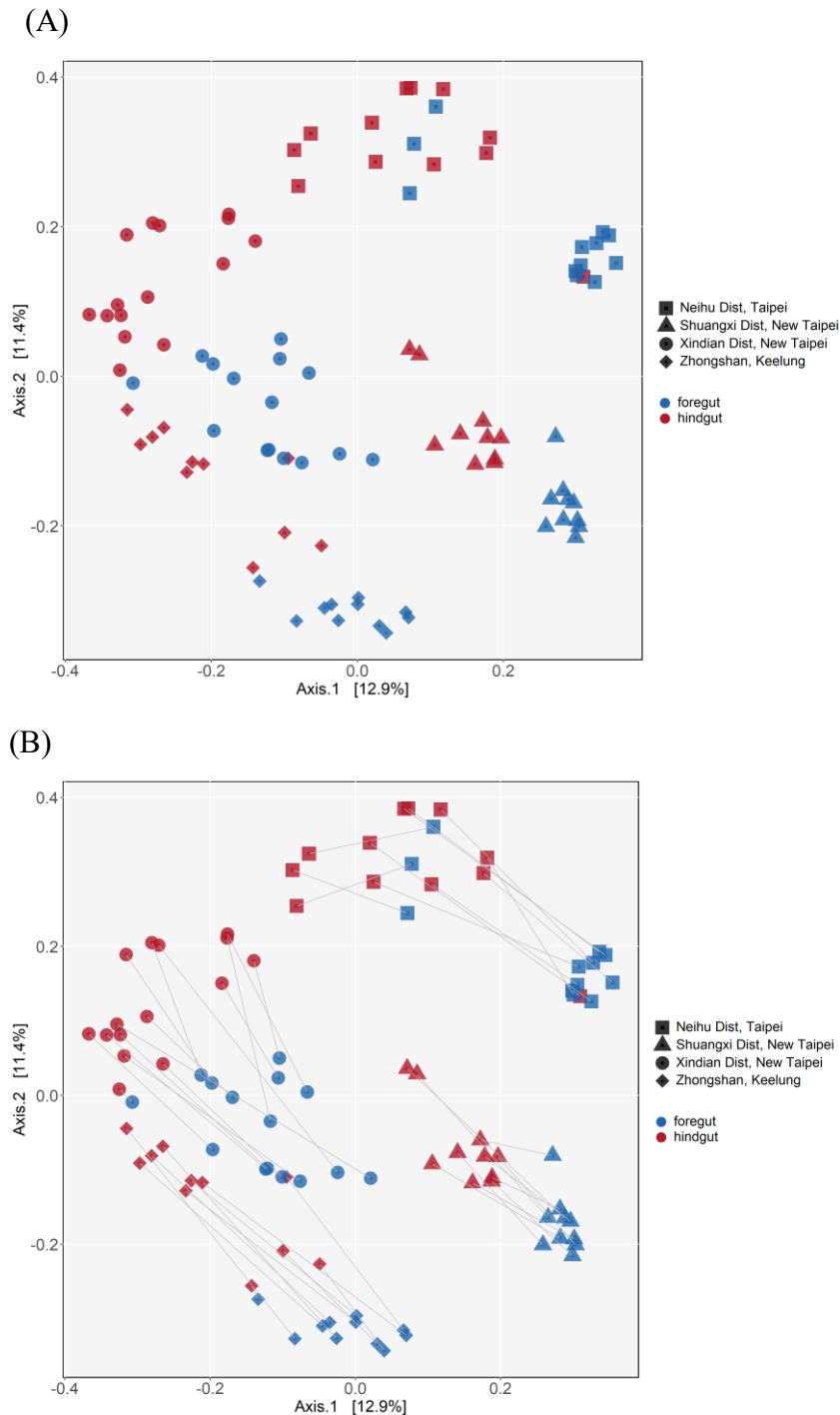


圖 18 蚯蚓腸道土壤前、後腸之主座標分析 (PCoA)

(A)基於 Bray-Curtis 計算樣本距離矩陣以 PCoA 分析，比較四個地區蚯蚓腸道土壤前、後腸之間菌相物種組成差異。不同顏色表示前、後腸，不同形狀表示採集地區，PCoA1 與 PCoA2 分別可以解釋 12.9 %與 11.4 %的變異；(B)將同一隻個體的蚯蚓前、後腸道連線。以地區而言，蚯蚓腸道菌相組成組間差異(內湖、雙溪、新店、基隆)大於組內差異 (ANOSIM, $R = 0.5413$ 、 $p = 0.001$)；以腸道位置而言，蚯蚓腸道菌相組成組間差異(蚯蚓腸道土壤前、後腸)大於組內差異 (ANOSIM, $R = 0.2979$ 、 $p = 0.001$)。

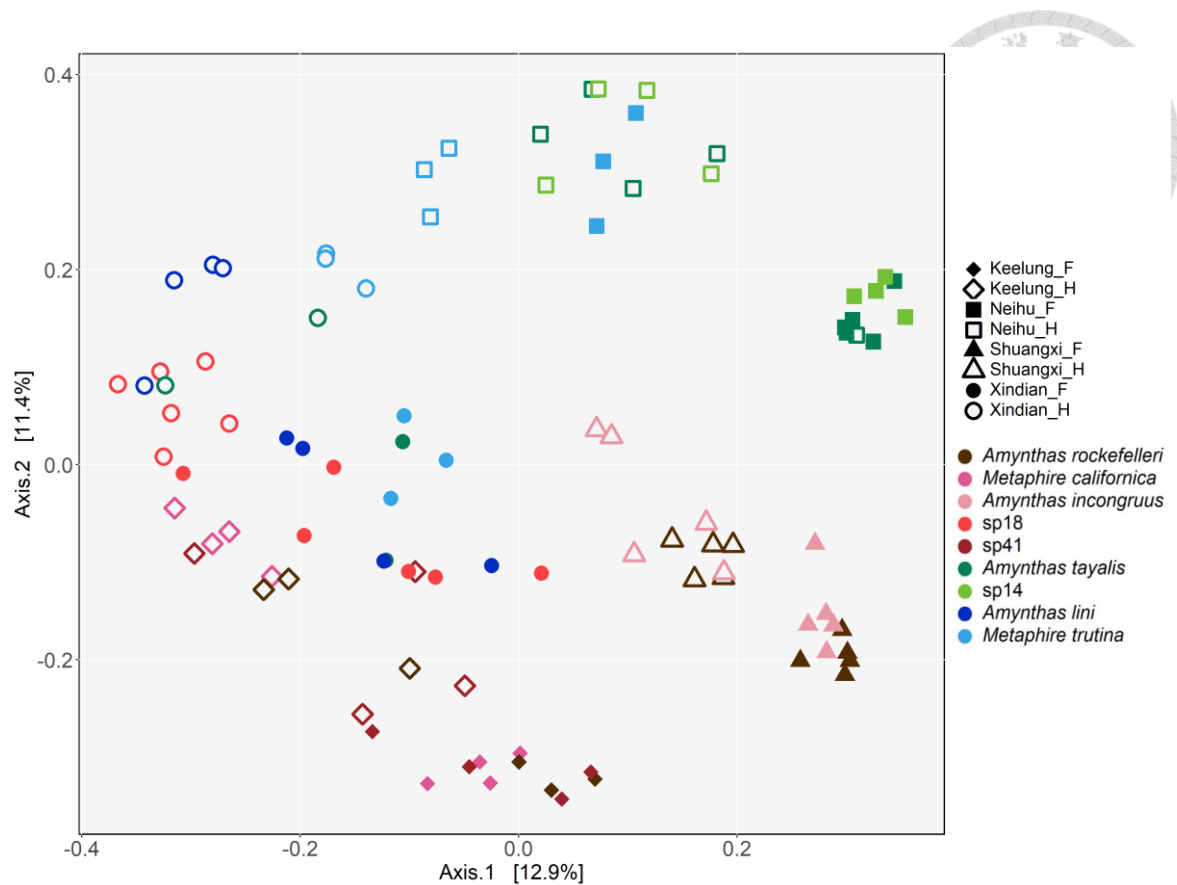


圖 19 不同物種蚯蚓腸道土壤前、後腸之主座標分析 (PCoA)

基於 Bray-Curtis 計算樣本距離矩陣以 PCoA 分析，比較四個地區蚯蚓腸道土壤前、後腸之間菌相物種組成差異。顏色表示蚯蚓物種、形狀表示樣區、空心為前腸、實心為後腸；PCoA1 與 PCoA2 分別可以解釋 12.9% 與 11.4% 的變異。相同樣區的不同物種距離較近；相較之下，不同樣區的相同物種間距離較遠。

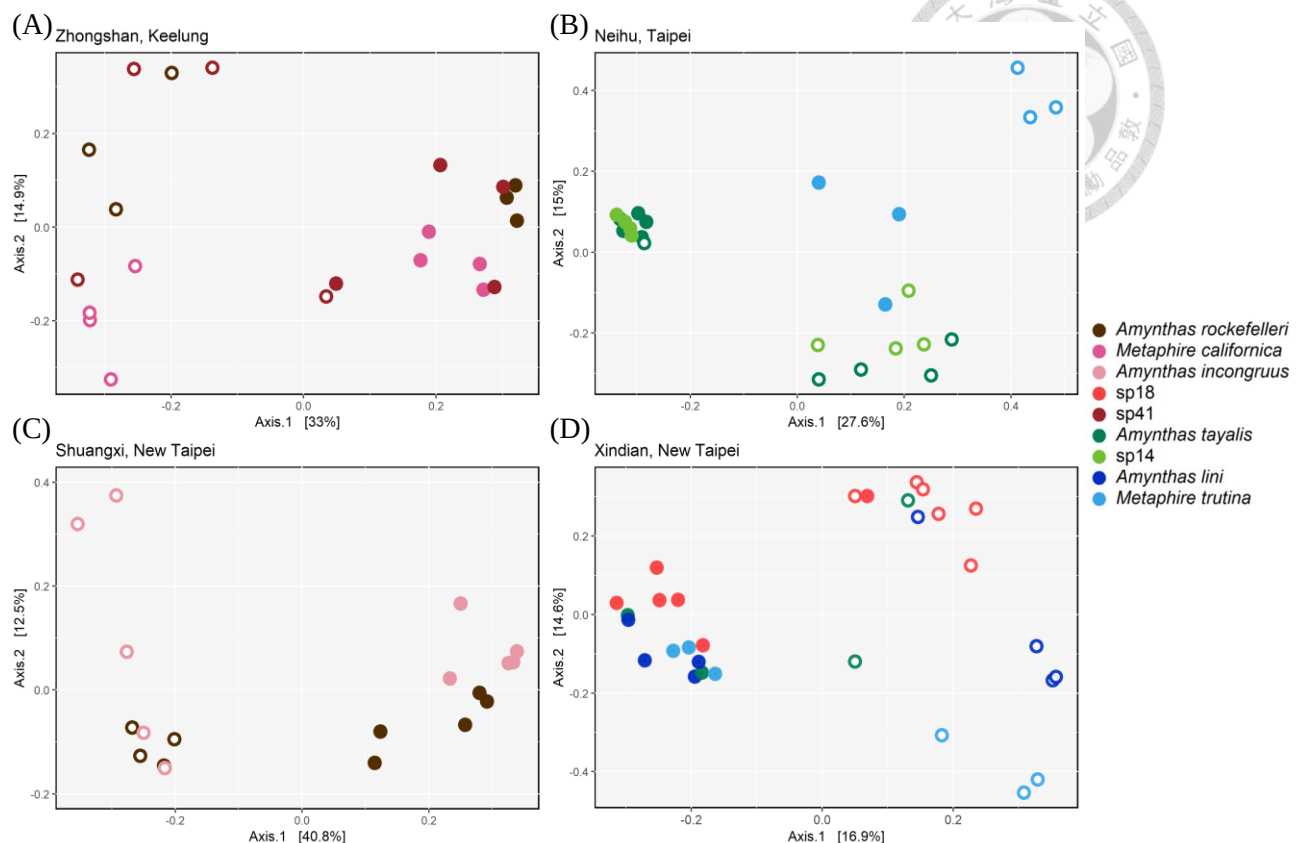


圖 20 各樣區不同物種蚯蚓腸道土壤前、後腸之主座標分析 (PCoA)

基於 Bray-Curtis 計算樣本距離矩陣以 PCoA 分析，各別比較四個樣區蚯蚓腸道土壤前、後腸之間菌相物種組成差異。顏色表示蚯蚓物種、空心為前腸、實心為後腸，四個樣區之 PCoA1 約可解釋 16%~40% 的變異，PCoA2 則為 12%~15%。四個樣區以腸道類型而言，菌相組成的組間差異(蚯蚓腸道土壤前、後腸)顯著大於組內差異 (ANOSIM，基隆市中山： $R=0.9879$ 、 $p=0.001$ ，台北市內湖： $R=0.5729$ 、 $p=0.001$ ，新北市雙溪： $R=0.8224$ 、 $p=0.001$ ，新北市新店： $R=0.557$ 、 $p=0.001$)。四個地區蚯蚓物種菌相組成組間差異顯著大於組內差異 (ANOSIM，基隆市中山： $R=0.6561$ 、 $p=0.001$ ，台北市內湖： $R=0.4251$ 、 $p=0.001$ ，新北市雙溪： $R=0.5764$ 、 $p=0.001$ ，新北市新店： $R=0.4552$ 、 $p=0.001$)。

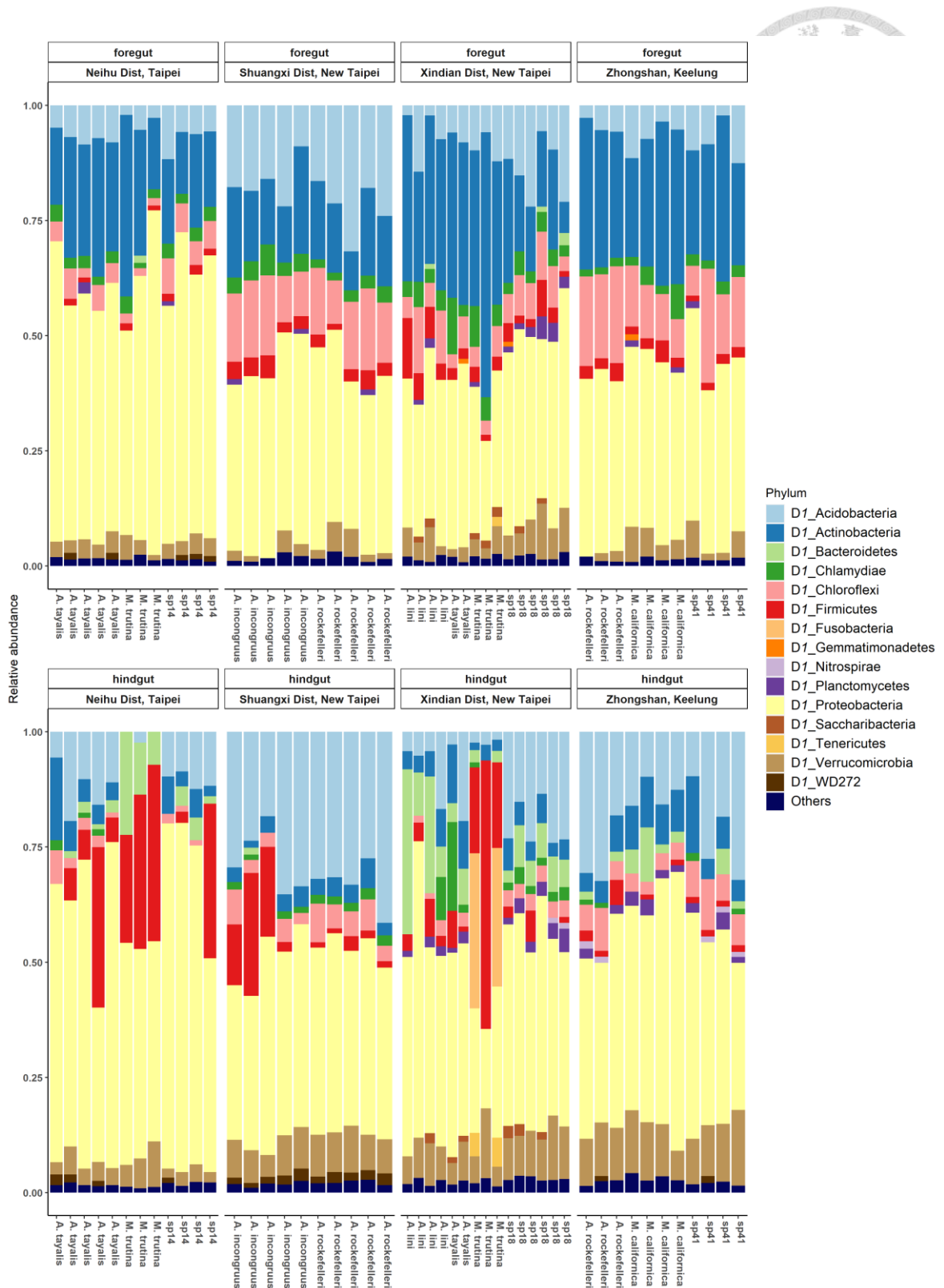


圖 21 蚯蚓前、後腸土壤優勢菌群菌門(Phylum)階層之相對豐度

上下對應之樣本來自同一隻蚯蚓個體，前腸在上、後腸在下，學名標示於圖型下方；僅列出菌門相對豐度高於 0.1% 者。除了前後腸間比較可明顯見到菌門組成的差異外，同樣區內可觀察到不同物種蚯蚓菌門組成的差異。

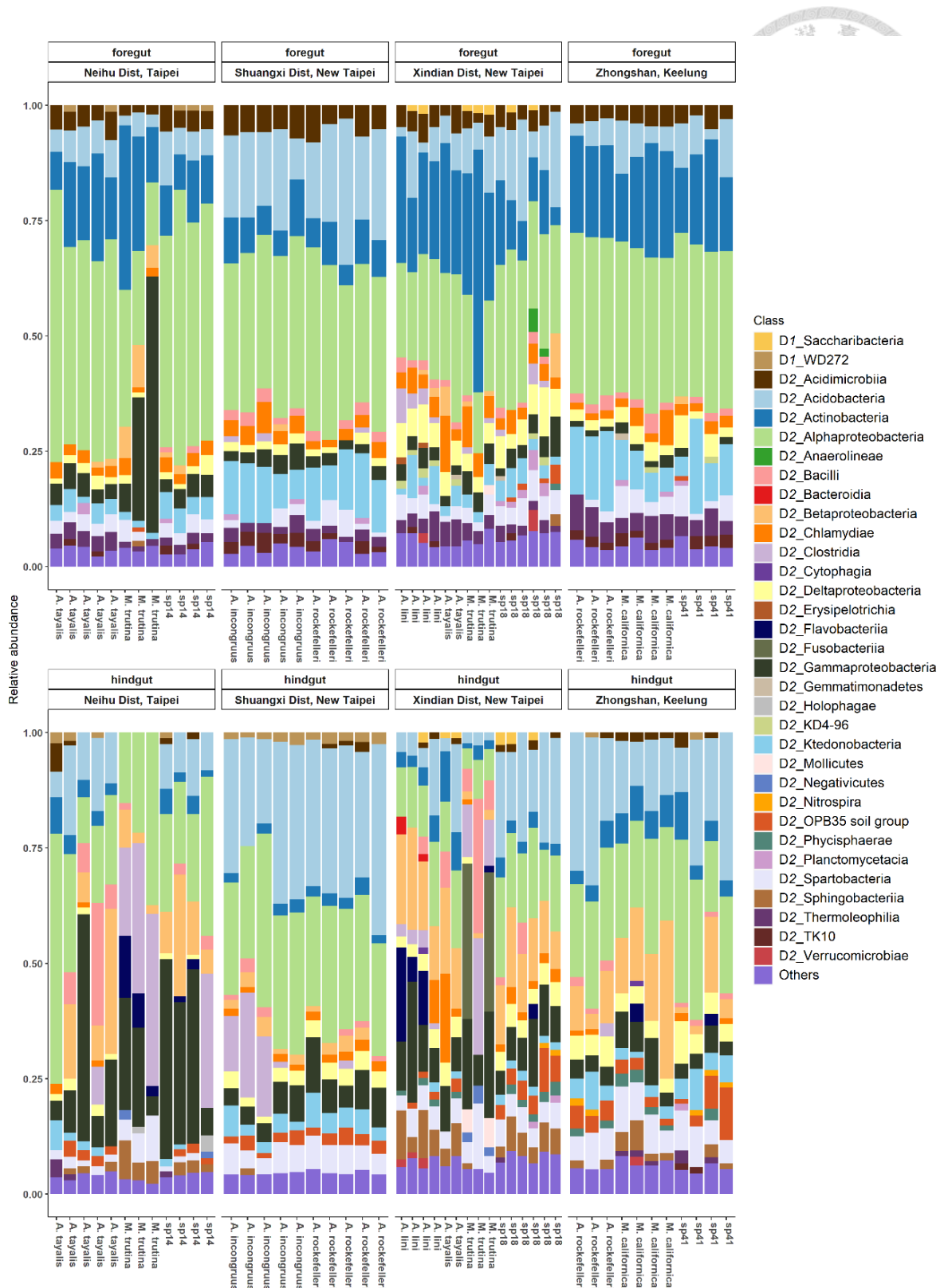


圖 22 蚯蚓前、後腸土壤優勢菌群菌綱(Class)階層之相對豐度

上下對應之樣本來自同一隻蚯蚓個體，前腸在上、後腸在下，學名標示於圖型下方；僅列出菌綱相對豐度高於 0.1% 者。除了前後腸間比較可明顯見到菌綱組成的差異外，同樣區內可觀察到不同物種蚯蚓菌綱組成的差異。

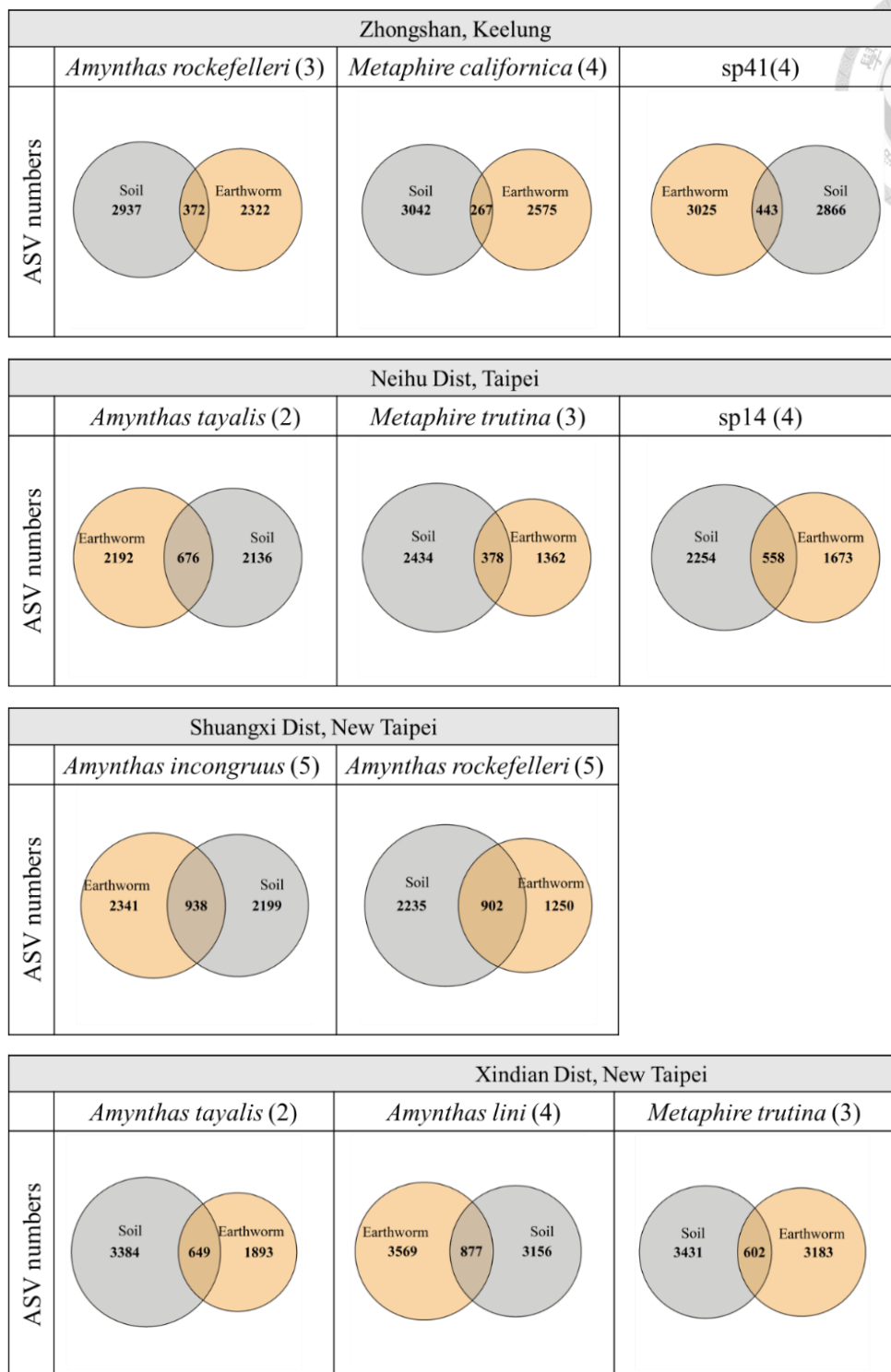


圖 24 周界土壤與蚯蚓腸道土壤菌相 ASV 文氏圖

各採集樣點內周界土壤與不同物種蚯蚓腸道土壤菌相 ASV 種數比較，蚯蚓腸道中獨有的 ASV 種數明顯高於與土壤共享的 ASV 種數。在每個圖中，ASV 種數較高者皆置於左側。

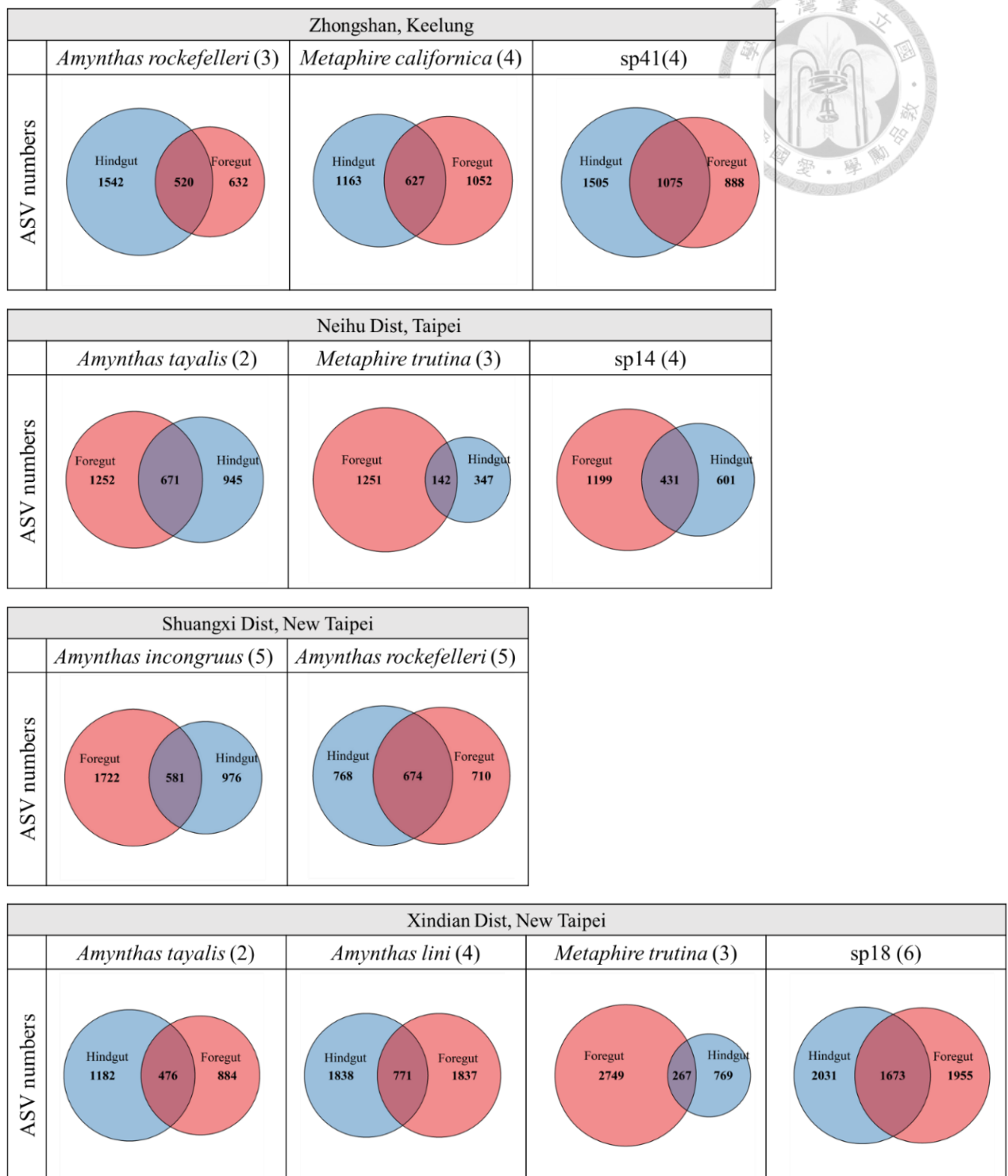


圖 25 蚯蚓腸道土壤前、後腸菌相 ASV 文氏圖

各採集樣點內不同物種蚯蚓腸道土壤前、後腸菌相 ASV 種數比較；除了 sp41 以外，每種蚯蚓前、後腸道共享 ASV 種數皆同時低於前腸與後腸，顯示腸道前、後段菌群差異大且獨特性高。在每個圖中，ASV 種數較高者皆置於左側。

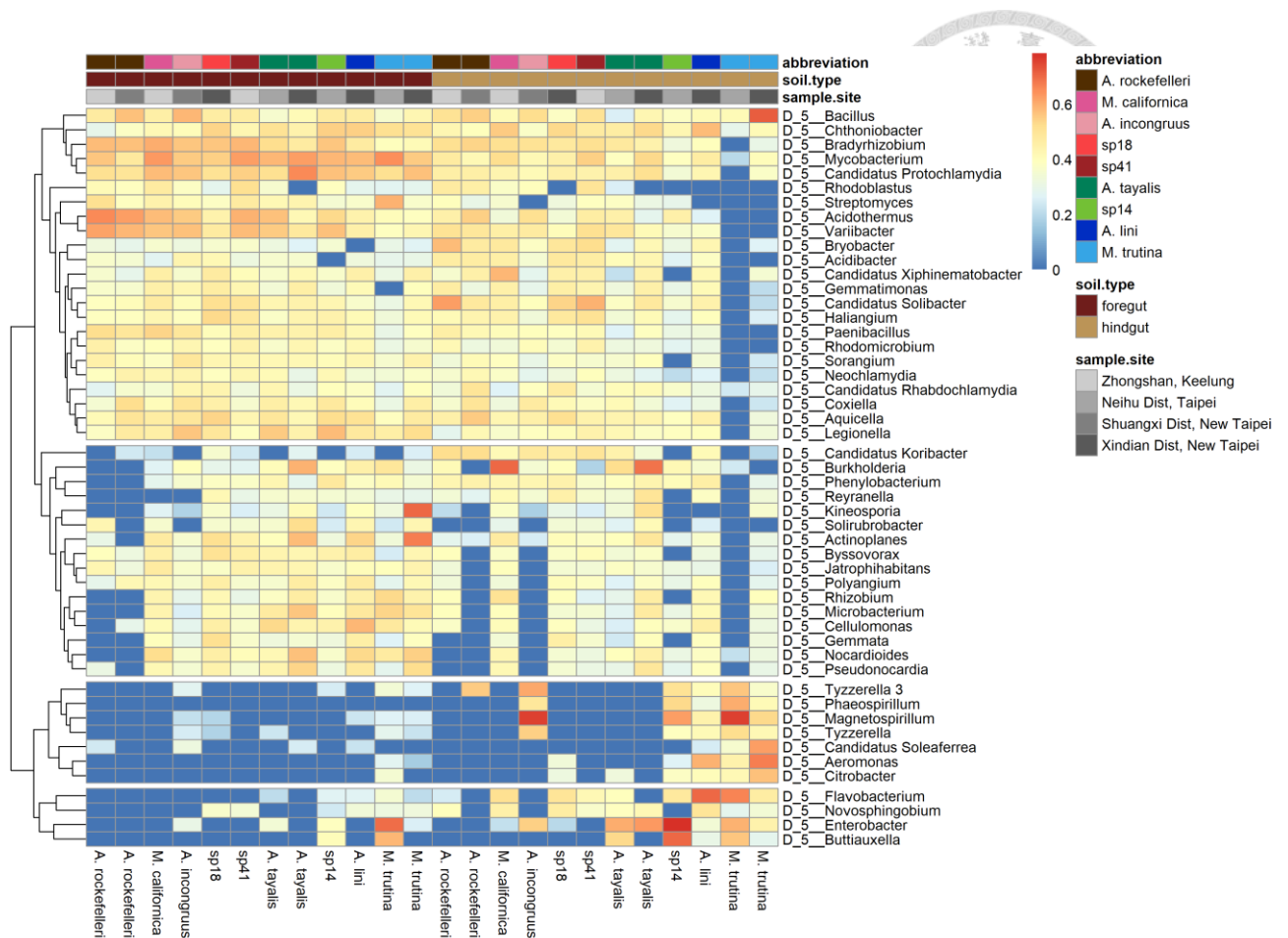


圖 26 僅存在於蚯蚓腸道土壤菌群已知最小階層之熱點圖

挑出每個樣區土壤菌相中僅存在於蚯蚓腸道的 ASV，將已知最小階層相同之 ASV 合併後製圖，並僅呈現相對豐度最高的前 40 個菌群。圖中左半部為前腸土壤、右半部為後腸土壤，紅色與藍色分別為相對豐度高與低，數值為各菌群相對豐度百分比取根號六次方。相似度分析以歐式距離(Euclidean distance)作為基準，以平均連結演算法進行分群(average-linkage algorithm)。 *A. rockefelleri*、*A. tayalis* 與 *M. trutina* 三個物種皆出現在兩個樣區，故在圖中左右兩半部皆重複出現，其餘物種皆只出現一次。

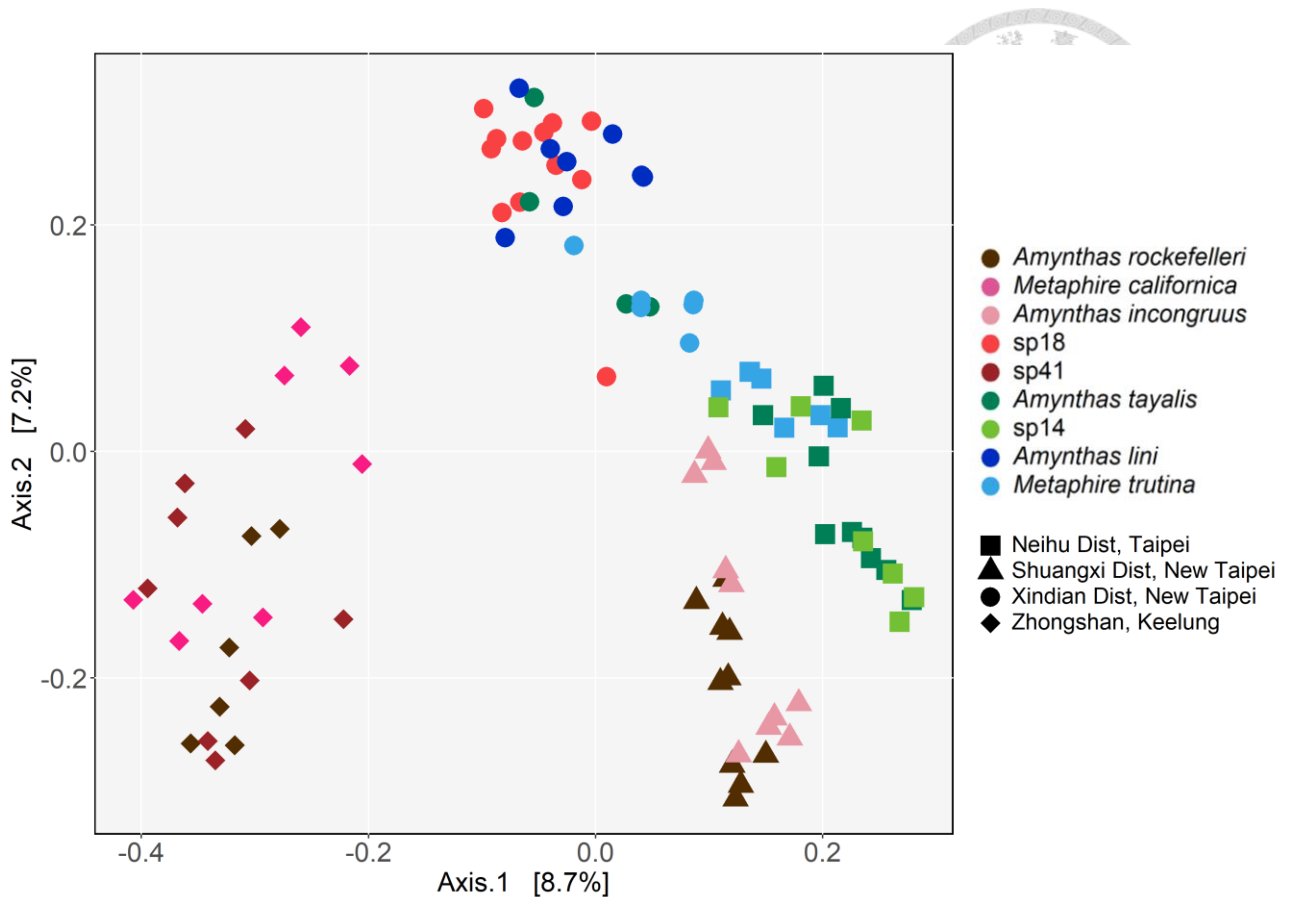


圖 27 僅存在於蚯蚓腸道土壤的 ASV 之主座標分析 (PCoA)

基於 Bray-Curtis 計算樣本距離矩陣以 PCoA 分析，挑出僅在蚯蚓腸道土壤出現的 ASV，比較四個樣區不同物種蚯蚓腸道土壤菌相物種組成差異。顏色表示蚯蚓物種、形狀表示樣區；PCoA1 與 PCoA2 分別可以解釋 8.7 %與 7.2 %的變異。以樣區而言，蚯蚓腸道菌相組成組間差異大於組內差異 (ANOSIM, $R=0.7297$ 、 $p=0.001$)；以蚯蚓物種而言，蚯蚓腸道菌相組成組間差異大於組內差異 (ANOSIM, $R=0.5451$ 、 $p=0.001$)。

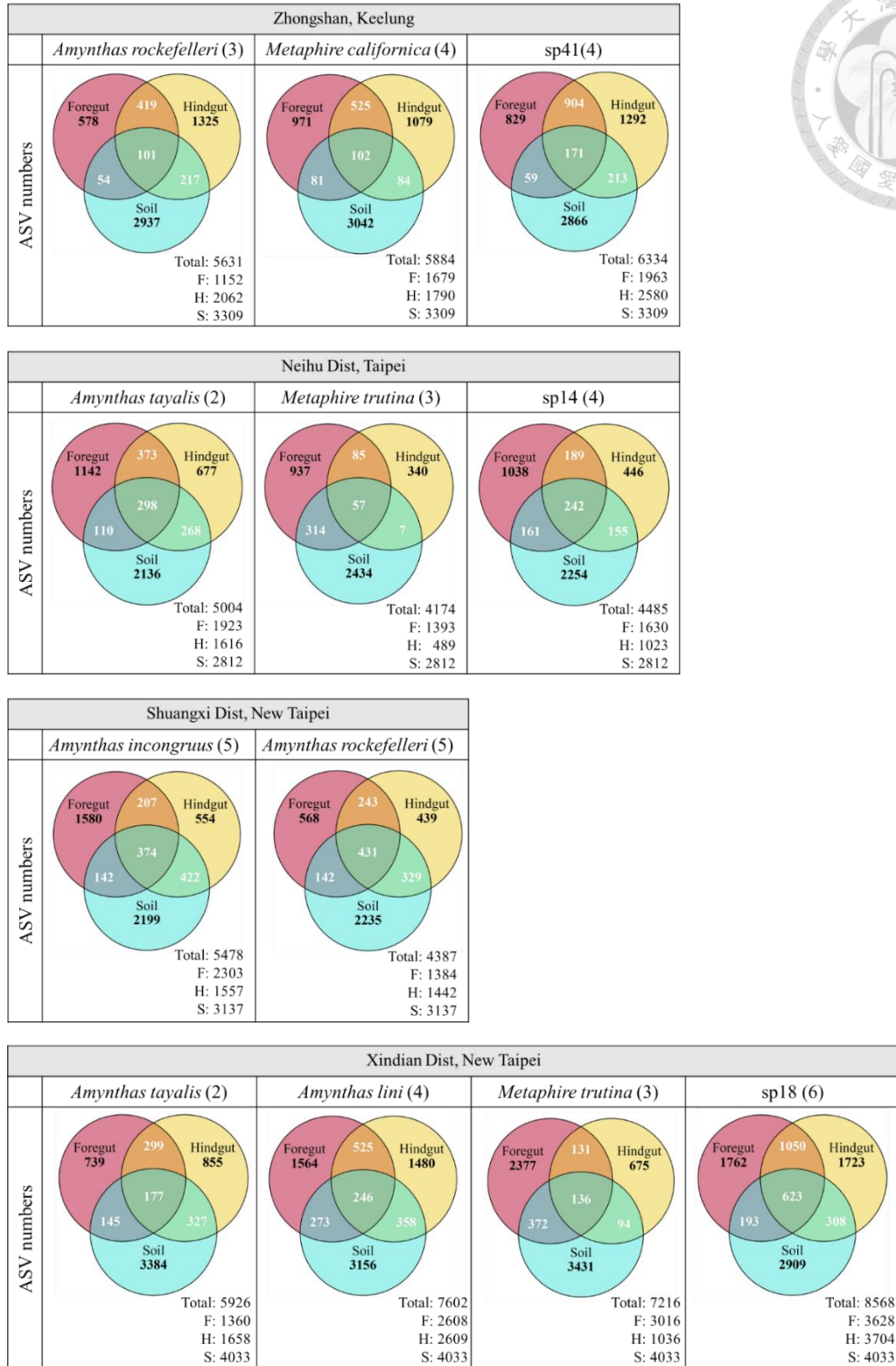


圖 28 周界土壤與蚯蚓腸道土壤前、後腸菌相 ASV 文氏圖

各樣區周界土壤與不同物種蚯蚓前、後腸土壤菌相 ASV 種數比較；每個圖的右下方標示 ASV 數量 (F: 前腸、H: 後腸、S: 周界土壤、Total: 總數)。

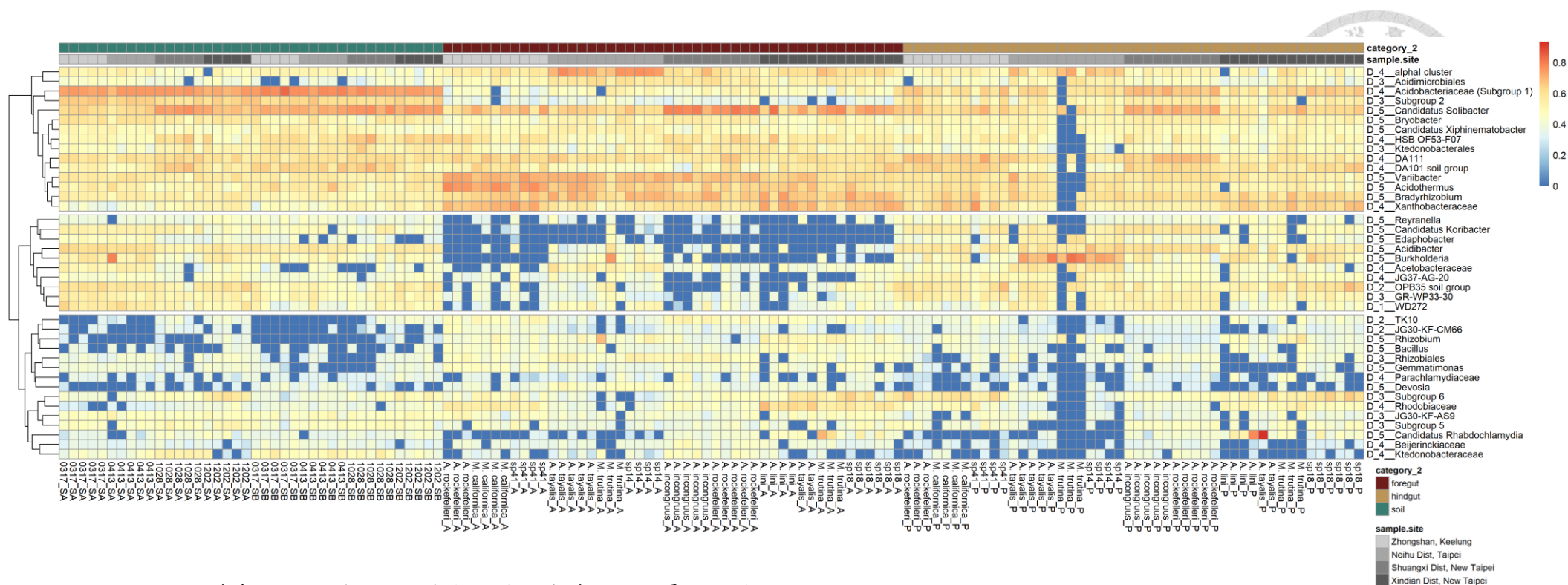


圖 29 同時存在於蚯蚓腸道土壤與周界土壤菌群已知最小階層之熱點圖

挑出同時存在於蚯蚓腸道土壤與周界土壤的菌群，將同一樣本中已知最小階層相同之 ASV 合併，僅呈現出相對豐度最高的前 40 菌群。取其相對豐度百分比後轉換根號六次方。相似度分析以歐式距離(Euclidean distance)作為基準，以平均連結演算法進行分群(average-linkage algorithm)。圖中由左至右依序為周界土壤、前腸土壤、後腸土壤。

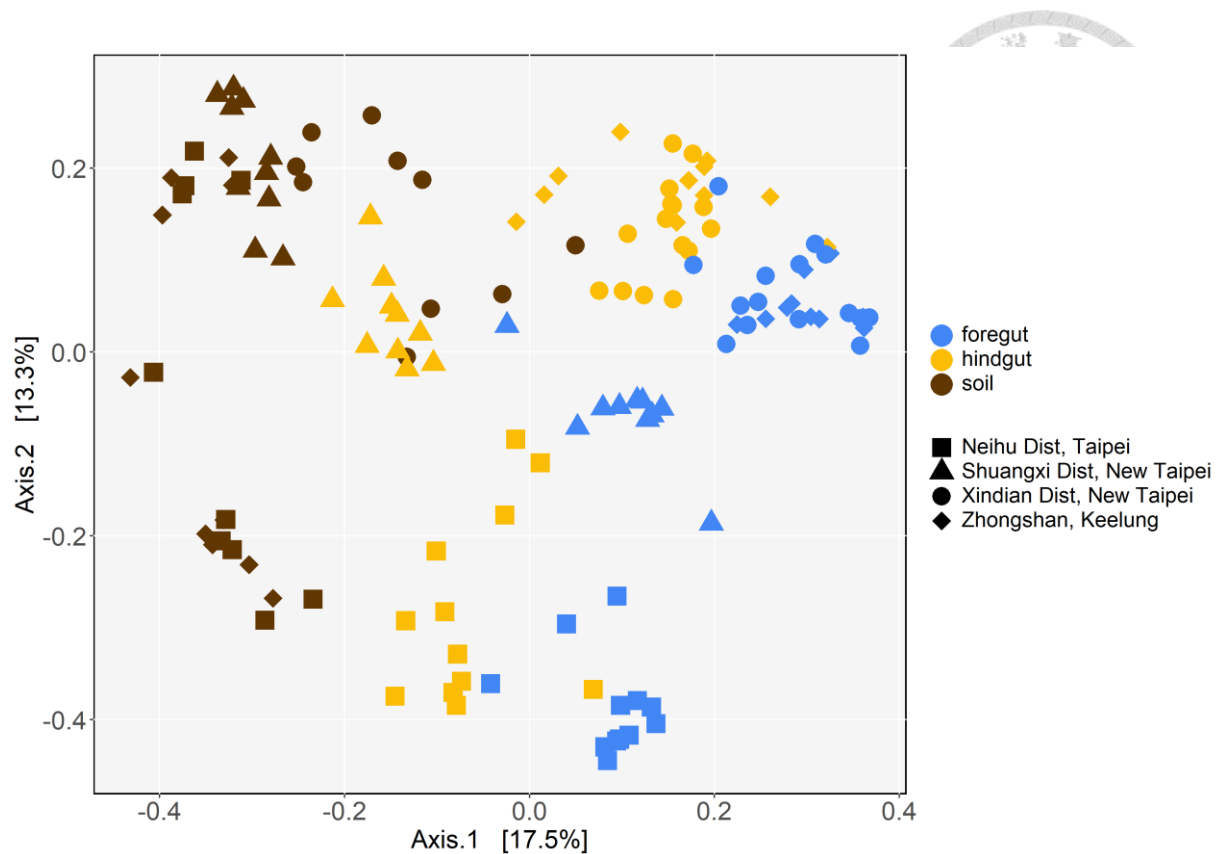


圖 30 同時存在於蚯蚓腸道土壤與周界土壤的 ASV 之主座標分析 (PCoA)

基於 Bray-Curtis 計算樣本距離矩陣以 PCoA 分析，挑出同時存在於蚯蚓腸道土壤與周界土壤的 ASV，比較周界土壤與蚯蚓腸道土壤菌相物種組成差異。藍色、黃色、棕色分別為前腸、後腸、周界土壤，形狀表示採集地區；PCoA1 與 PCoA2 分別可以解釋 17.5 %與 13.3 %的變異。以地區而言，菌相組成組間差異大於組內差異(ANOSIM, $R=0.3927$ 、 $p=0.001$)；以土壤類型而言，菌相組成組間差異(周界土壤與蚯蚓腸道土壤前、後腸)大於組內差異(ANOSIM, $R=0.4668$ 、 $p=0.001$)。圖中可見周界土壤的菌相與後腸土壤較為相似，與前腸相距較遠。

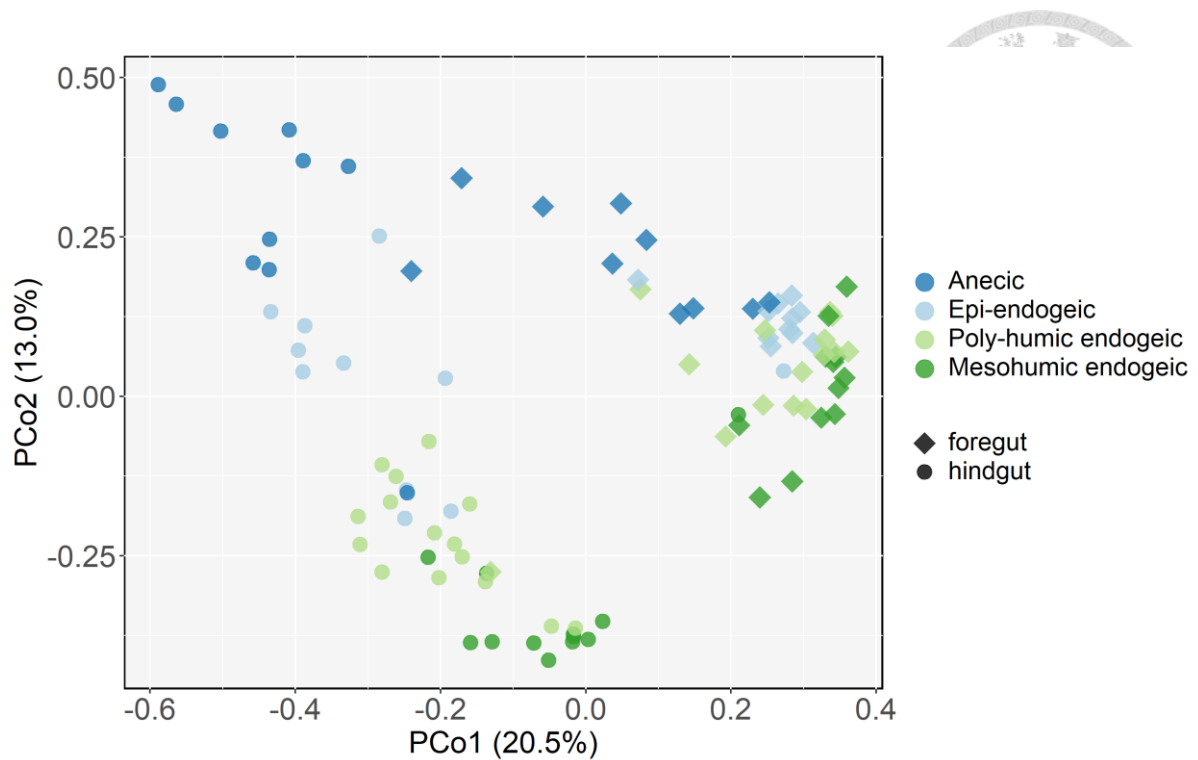
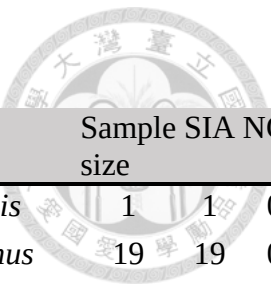


圖 31 不同蚯蚓功能群腸道菌相已知最小階層之主座標分析 (PCoA)

腸道菌相資料中已知最小階層相同的 ASV 合併，以 Bray-Curtis 計算樣本距離矩陣後以 PCoA 分析。四個顏色分別代表四個蚯蚓生態群，菱形為前腸、圓形為後腸。可看到前後腸菌相明顯不同，四個生態群間亦呈現差異，從圖中左上到右下依序為 anecic、epi-endogeic、polyhumic endogeic、mesohumic endogeic，與以落葉為食或以土壤為食的趨勢一致。

表 1 各樣區採集資訊與分析樣本數量



Location	Date	Coordinates	Temperature (°C)	Moisture (%)	Precipitation (mm)	Species	Sample SIA NGS size		
Zhongshan, Keelung	2021.03.17	25°09'37.70"N 121°42'29.91"E	19.30	30.80	242	<i>Amyntas corticis</i>	1	1	0
						<i>Amyntas minimus</i>	19	19	0
						<i>Amyntas rockefelleri</i>	3	3	3
						<i>Drawida</i> sp02	1	1	0
						<i>Metaphire californica</i>	15	15	5
						sp41	4	4	4
Neihu District, Taipei	2021.04.13	25°06'52.39"N 121°35'31.11"E	25.00	19.83	51	<i>Amyntas tayalis</i>	17	17	5
						<i>Metaphire trutina</i>	3	3	3
						sp14	4	4	4
Shuangxi, New Taipei	2021.10.28	25°02'25.70"N 121°49'10.37"E	20.72	34.50	579.5	<i>Amyntas incongruus</i>	25	25	5
						<i>Amyntas rockefelleri</i>	19	19	5
Xindian, New Taipei	2021.12.02	24°56'46.91"N 121°27'43.46"E	17.00	16.00	68.5	<i>Amyntas lini</i>	11	11	5
						<i>Amyntas minimus</i>	4	4	0
						<i>Amyntas tayalis</i>	3	3	2
						<i>Metaphire trutina</i>	4	4	3
						<i>Metaphire yuhsi</i>	1	1	0
						sp18	16	16	6

SIA: stable isotope analysis

NGS: next generation sequencing

表 2 落葉、0-5 cm 土壤、15-20 cm 土壤之 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 平均值及標準差

Location	Type	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	SD	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	SD
Zhongshan, Keelung	Leaf litter	-30.12	0.33	0.42	0.18
	Soil 0-5 cm	-26.80	1.00	3.46	0.54
	Soil 15-20 cm	-21.14	1.14	5.79	0.31
Neihu District, Taipei	Leaf litter	-31.81	0.15	-2.72	0.26
	Soil 0-5 cm	-27.06	1.82	2.37	1.18
	Soil 15-20 cm	-22.71	2.10	5.34	1.45
Shuangxi, New Taipei	Leaf litter	-32.23	0.24	-1.54	0.29
	Soil 0-5 cm	-26.23	1.15	4.13	0.51
	Soil 15-20 cm	-22.07	1.35	6.52	0.44
Xindian, New Taipei	Leaf litter	-31.34	0.26	-1.43	0.37
	Soil 0-5 cm	-28.50	1.13	1.80	0.87
	Soil 15-20 cm	-25.60	1.82	4.12	1.20

表 3 各物種之蚯蚓 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 平均值及標準差

Location	Species	n	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	SD	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	SD
Zhongshan, Keelung	<i>Amyntas corticis</i>	1	-26.82	-	1.67	-
	<i>Amyntas minimus</i>	19	-25.87	0.97	4.48	0.23
	<i>Amyntas rockefelleri</i>	3	-26.13	0.02	6.01	0.22
	<i>Drawida</i> sp02	1	-26.03	-	4.92	-
	<i>Metaphire californica</i>	15	-26.09	0.34	3.57	0.30
	sp41	4	-26.04	0.45	4.22	0.36
Neihu, Taipei	<i>Amyntas tayalis</i>	17	-27.35	0.23	0.72	0.35
	<i>Metaphire trutina</i>	3	-28.31	0.23	-0.27	0.31
	sp14	4	-27.32	0.29	0.77	0.36
Shuangxi, New Taipei	<i>Amyntas incongruus</i>	25	-26.65	0.33	2.18	0.61
	<i>Amyntas rockefelleri</i>	19	-26.09	0.34	4.99	0.33
Xindian, New Taipei	<i>Amyntas lini</i>	11	-26.87	0.16	0.55	0.33
	<i>Amyntas minimus</i>	4	-26.39	0.23	3.15	0.48
	<i>Amyntas tayalis</i>	3	-27.23	0.29	0.82	0.34
	<i>Metaphire trutina</i>	4	-27.96	0.53	-0.98	1.05
	<i>Metaphire yuhsi</i>	1	-27.18	-	0.55	-
	sp18	16	-26.34	0.41	1.94	0.33

表 4 各樣區之 0-5 cm 土壤、15-20 cm 土壤之 ASV 種數

Location	Sample ID* (0-5 cm)	ASV no.	Sample ID (15-20 cm)	ASV no.
Zhongshan, Keelung	0317_S02_A	71354	0317_S02_B	49016
	0317_S04_A	64709	0317_S04_B	57028
	0317_S05_A	66885	0317_S05_B	55004
	0317_S06_A	60739	0317_S06_B	61934
	0317_S07_A	52111	0317_S07_B	38830
Neihu , Taipei	0413_S01_A	44200	0413_S01_B	56515
	0413_S02_A	59170	0413_S02_B	60433
	0413_S04_A	61248	0413_S04_B	58524
	0413_S05_A	68641	0413_S05_B	55030
	0413_S08_A	44364	0413_S08_B	41514
Shuangxi, New Taipei	1028_S03_A	78184	1028_S03_B	67809
	1028_S05_A	47198	1028_S05_B	63972
	1028_S06_A	58304	1028_S06_B	66432
	1028_S07_A	53898	1028_S07_B	46627
	1028_S08_A	51264	1028_S08_B	86576
Xindian, New Taipei	1202_S01_A	61746	1202_S01_B	62709
	1202_S03_A	58015	1202_S03_B	42196
	1202_S06_A	56122	1202_S06_B	51059
	1202_S07_A	77119	1202_S07_B	57346
	1202_S09_A	55312	1202_S09_B	68247

*A 表示為 0-5 cm 土壤、B 表示為 15-20 cm 土壤

表 5 蚯蚓腸道前、後腸之 ASV 種數

Location	Sample ID* (foregut)	ASV no.	Sample ID (hindgut)	ASV no.
Zhongshan, Keelung	SIEW0203_A	17354	SIEW0203_P	55037
	SIEW0205_A	55319	SIEW0205_P	42208
	SIEW0228_A	76051	SIEW0228_P	66972
	SIEW0229_A	39382	SIEW0229_P	75274
	SIEW0230_A	34181	SIEW0230_P	57230
	SIEW0231_A	42365	SIEW0231_P	76041
	SIEW0232_A	57188	SIEW0232_P	80366
	SIEW0234_A	61322	SIEW0234_P	87362
	SIEW0236_A	64304	SIEW0236_P	70013
	SIEW0237_A	72110	SIEW0237_P	81084
	SIEW0238_A	66389	SIEW0238_P	72888
	SIEW0239_A	76704	SIEW0239_P	82356
Neihu Taipei	SIEW0227_A	41886	SIEW0227_P	59801
	SIEW0246_A	59981	SIEW0246_P	32914
	SIEW0247_A	64661	SIEW0247_P	36724
	SIEW0248_A	47214	SIEW0248_P	60457
	SIEW0249_A	51350	SIEW0249_P	55117
	SIEW0253_A	50005	SIEW0253_P	76247
	SIEW0254_A	56278	SIEW0254_P	54457
	SIEW0263_A	60785	SIEW0263_P	60344
	SIEW0265_A	52037	SIEW0265_P	48135
	SIEW0266_A	36847	SIEW0266_P	46794
	SIEW0267_A	61303	SIEW0267_P	45672
	SIEW0268_A	56506	SIEW0268_P	33800

Shuangxi,
New Taipei

SIEW0307_A	44462	SIEW0307_P	33857
SIEW0308_A	26371	SIEW0308_P	43533
SIEW0310_A	46669	SIEW0310_P	63123
SIEW0317_A	49717	SIEW0317_P	65217
SIEW0318_A	52622	SIEW0318_P	48145
SIEW0326_A	58993	SIEW0326_P	63542
SIEW0330_A	50967	SIEW0330_P	54317
SIEW0331_A	52778	SIEW0331_P	56099
SIEW0339_A	53212	SIEW0339_P	66047
SIEW0342_A	55561	SIEW0342_P	60151

SIEW0361_A	66123	SIEW0361_P	63475
SIEW0362_A	45939	SIEW0362_P	53060
SIEW0363_A	63092	SIEW0363_P	69792
SIEW0365_A	64635	SIEW0365_P	74551
SIEW0366_A	61930	SIEW0366_P	59067
SIEW0371_A	59616	SIEW0371_P	66020
SIEW0372_A	70510	SIEW0372_P	51837
SIEW0377_A	54663	SIEW0377_P	62034
SIEW0378_A	54693	SIEW0378_P	56928
SIEW0379_A	14088	SIEW0379_P	58029
SIEW0380_A	55395	SIEW0380_P	51058
SIEW0381_A	67158	SIEW0381_P	86623
SIEW0382_A	50045	SIEW0382_P	61477
SIEW0383_A	55963	SIEW0383_P	82432
SIEW0384_A	42976	SIEW0384_P	35119
SIEW0385_A	53813	SIEW0385_P	71278

Xindian,
New Taipei

*A 表示為蚯蚓前腸、P 表示為蚯蚓後腸

表 6 各樣區之周界土壤菌相 α 多樣性指數分析

Location	Sample ID*	Observed richness	Shannon
Zhongshan, Keelung	0317_S02_A	900	6.394
	0317_S02_B	689	6.127
	0317_S04_A	808	6.308
	0317_S04_B	724	6.121
	0317_S05_A	921	6.397
	0317_S05_B	853	6.243
	0317_S06_A	767	6.263
	0317_S06_B	787	6.084
	0317_S07_A	741	6.186
	0317_S07_B	640	6.053
Neihu Dist, Taipei	0413_S01_A	628	5.625
	0413_S01_B	729	6.172
	0413_S02_A	589	6.029
	0413_S02_B	747	6.225
	0413_S04_A	624	6.089
	0413_S04_B	696	6.104
	0413_S05_A	728	6.239
	0413_S05_B	709	6.069
	0413_S08_A	435	5.742
	0413_S08_B	496	5.762
Shuangxi Dist, New Taipei	1028_S03_A	933	6.331
	1028_S03_B	1056	6.385
	1028_S05_A	658	6.023
	1028_S05_B	808	6.041
	1028_S06_A	752	6.081
	1028_S06_B	793	6.116
	1028_S07_A	736	6.005
	1028_S07_B	601	6.020
	1028_S08_A	651	6.018
	1028_S08_B	1227	6.401
Xindian Dist, New Taipei	1202_S01_A	988	6.524
	1202_S01_B	760	6.276
	1202_S03_A	668	6.183
	1202_S03_B	712	6.152
	1202_S06_A	798	6.368
	1202_S06_B	795	6.274
	1202_S07_A	934	6.478
	1202_S07_B	859	6.425

*A 表示為 0-5 cm 土壤、B 表示為 15-20 cm 土壤

表 7 蚯蚓腸道前、後腸菌相 α 多樣性指數分析

Location	Sample ID*	Observed richness	Shannon	Species
Zhongshan, Keelung	SIEW0205_A	758	6.177	<i>M. californica</i>
	SIEW0205_P	570	6.066	<i>M. californica</i>
	SIEW0228_A	996	6.427	<i>M. californica</i>
	SIEW0228_P	1015	6.491	<i>M. californica</i>
	SIEW0229_A	537	5.823	<i>M. californica</i>
	SIEW0229_P	780	6.307	<i>M. californica</i>
	SIEW0230_A	599	5.938	<i>M. californica</i>
	SIEW0230_P	745	5.099	<i>M. californica</i>
	SIEW0231_A	578	5.894	<i>A. rockefelleri</i>
	SIEW0231_P	1126	6.675	<i>A. rockefelleri</i>
	SIEW0232_A	697	6.049	<i>A. rockefelleri</i>
	SIEW0232_P	1026	6.461	<i>A. rockefelleri</i>
	SIEW0234_A	591	5.944	<i>A. rockefelleri</i>
	SIEW0234_P	1125	6.521	<i>A. rockefelleri</i>
	SIEW0236_A	982	6.409	sp41
	SIEW0236_P	1000	6.354	sp41
	SIEW0237_A	698	5.873	sp41
	SIEW0237_P	776	6.269	sp41
	SIEW0238_A	747	6.107	sp41
	SIEW0238_P	1171	6.646	sp41
Neihu Dist, Taipei	SIEW0239_A	941	6.330	sp41
	SIEW0239_P	1111	6.555	sp41
	SIEW0227_A	440	5.641	<i>A. tayalis</i>
	SIEW0227_P	590	5.944	<i>A. tayalis</i>
	SIEW0249_A	822	6.036	<i>A. tayalis</i>
	SIEW0249_P	581	5.752	<i>A. tayalis</i>
	SIEW0253_A	734	5.859	<i>A. tayalis</i>
	SIEW0253_P	665	4.692	<i>A. tayalis</i>
	SIEW0254_A	622	5.873	<i>A. tayalis</i>
	SIEW0254_P	595	4.911	<i>A. tayalis</i>
	SIEW0263_A	702	5.888	<i>A. tayalis</i>
	SIEW0263_P	566	5.404	<i>A. tayalis</i>
	SIEW0246_A	541	5.181	<i>M. trutina</i>
	SIEW0246_P	199	4.418	<i>M. trutina</i>
	SIEW0247_A	742	5.304	<i>M. trutina</i>
	SIEW0247_P	246	4.397	<i>M. trutina</i>



Shuangxi Dist, New Taipei	SIEW0248_A	472	4.682	<i>M. trutina</i>
	SIEW0248_P	239	4.030	<i>M. trutina</i>
	SIEW0265_A	542	5.650	sp14
	SIEW0265_P	445	4.652	sp14
	SIEW0266_A	470	5.497	sp14
	SIEW0266_P	429	4.995	sp14
	SIEW0267_A	974	6.050	sp14
	SIEW0267_P	503	5.135	sp14
	SIEW0268_A	782	6.080	sp14
	SIEW0268_P	328	5.076	sp14
	SIEW0307_A	543	5.706	<i>A. rockefelleri</i>
	SIEW0307_P	520	5.609	<i>A. rockefelleri</i>
	SIEW0308_A	406	5.592	<i>A. rockefelleri</i>
	SIEW0308_P	611	5.935	<i>A. rockefelleri</i>
	SIEW0310_A	581	5.512	<i>A. rockefelleri</i>
	SIEW0310_P	837	6.193	<i>A. rockefelleri</i>
	SIEW0317_A	670	5.877	<i>A. rockefelleri</i>
	SIEW0317_P	835	6.149	<i>A. rockefelleri</i>
	SIEW0318_A	620	5.639	<i>A. rockefelleri</i>
	SIEW0318_P	525	5.642	<i>A. rockefelleri</i>
Xindian Dist, New Taipei	SIEW0326_A	955	6.031	<i>A. incongruus</i>
	SIEW0326_P	815	6.049	<i>A. incongruus</i>
	SIEW0330_A	622	5.672	<i>A. incongruus</i>
	SIEW0330_P	600	5.719	<i>A. incongruus</i>
	SIEW0331_A	717	5.779	<i>A. incongruus</i>
	SIEW0331_P	514	5.382	<i>A. incongruus</i>
	SIEW0339_A	766	5.849	<i>A. incongruus</i>
	SIEW0339_P	708	5.943	<i>A. incongruus</i>
	SIEW0342_A	926	6.193	<i>A. incongruus</i>
	SIEW0342_P	621	5.889	<i>A. incongruus</i>
	SIEW0361_A	1013	6.389	sp18
	SIEW0361_P	1065	6.467	sp18
	SIEW0362_A	691	6.073	sp18
	SIEW0362_P	983	6.510	sp18
	SIEW0363_A	1103	6.471	sp18
	SIEW0363_P	1143	6.452	sp18
	SIEW0365_A	1156	6.538	sp18
	SIEW0365_P	1194	6.588	sp18
	SIEW0366_A	1115	6.554	sp18
	SIEW0366_P	1057	6.570	sp18



SIEW0381_A	1128	6.640	sp18
SIEW0381_P	1646	6.933	sp18
SIEW0371_A	748	6.218	<i>A. lini</i>
SIEW0371_P	753	5.845	<i>A. lini</i>
SIEW0372_A	1250	6.492	<i>A. lini</i>
SIEW0372_P	631	5.774	<i>A. lini</i>
SIEW0382_A	872	6.398	<i>A. lini</i>
SIEW0382_P	1071	6.475	<i>A. lini</i>
SIEW0383_A	981	6.399	<i>A. lini</i>
SIEW0383_P	1368	6.560	<i>A. lini</i>
SIEW0377_A	923	5.759	<i>A. tayalis</i>
SIEW0377_P	637	4.593	<i>A. tayalis</i>
SIEW0378_A	633	6.113	<i>A. tayalis</i>
SIEW0378_P	1212	6.711	<i>A. tayalis</i>
SIEW0380_A	1311	6.625	<i>M. trutina</i>
SIEW0380_P	517	4.194	<i>M. trutina</i>
SIEW0384_A	897	5.755	<i>M. trutina</i>
SIEW0384_P	286	4.111	<i>M. trutina</i>
SIEW0385_A	1516	6.822	<i>M. trutina</i>
SIEW0385_P	546	4.241	<i>M. trutina</i>

*A 表示為蚯蚓前腸、P 表示為蚯蚓後腸

表 8 比較樣區之間周界土壤之 α 多樣性指數(one-way ANOVA)

Effect	Index	<i>F</i>	<i>p</i>
Location	Observed	4.486	0.0089
Location	Shannon	7.258	0.0006

p 值具有顯著差異者以粗體表示，組間差異表示“*”為 $p < 0.05$ ；組間差異表示“**”為 $p < 0.01$ ；組間差異表示“***”為 $p < 0.001$

表 9 周界土壤 α 多樣性指數在樣區之間兩兩成對比較(Tukey HSD Test)

Location comparison		Shannon <i>p</i> value	Observed richness <i>p</i> value
Zhongshan, Keelung	Neihu Dist, Taipei	0.135	0.050
Xindian Dist, New Taipei	Neihu Dist, Taipei	0.002	0.005
Shuangxi Dist, New Taipei	Neihu Dist, Taipei	0.471	0.050
Xindian Dist, New Taipei	Zhongshan, Keelung	0.471	1.000
Shuangxi Dist, New Taipei	Zhongshan, Keelung	0.471	1.000
Shuangxi Dist, New Taipei	Xindian Dist, New Taipei	0.028	1.000

表 10 各樣區內周界土壤與蚯蚓腸道菌相之 α 多樣性指數其中位數差異(Wilcoxon rank sum test)



Location	Effect	Observed richness <i>p</i> value	Shannon <i>p</i> value
Zhongshan, Keelung	Soil v.s Earthworm	0.5350	0.7950
Neihu Dist, Taipei		0.1590	0.000258***
Shuangxi Dist, New Taipei		0.0439*	0.00135**
Xindian Dist, New Taipei		0.0951	0.4880

p 值具有顯著差異者以粗體表示，組間差異表示 “*” 為 $p < 0.05$ ；組間差異表示 “**” 為 $p < 0.01$ ；組間差異表示 “***” 為 $p < 0.001$

表 11 蚯蚓腸道前、後段菌相之 α 多樣性指數其中位數差異(Wilcoxon signed-rank test)



Species	Effect	Observed richness	Shannon
		<i>p</i> value	<i>p</i> value
<i>Amyntas incongruus</i>		0.0625	0.8120
<i>Amyntas lini</i>		0.875	0.6250
<i>Amyntas rockefelleri</i>		0.0391*	0.0234*
<i>Amyntas tayalis</i>	Foregut	0.6880	0.2190
<i>Metaphire californica</i>	v.s	0.6250	0.875
<i>Metaphire trutina</i>	Hindgut	0.0313*	0.0313*
sp14		0.875	0.125
sp18		0.219	0.0938
sp41		0.125	0.25

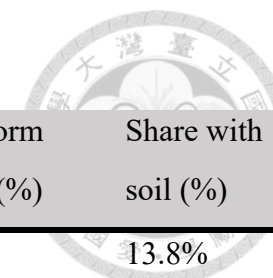


表 12 周界土壤與蚯蚓腸道共享及獨有 ASV 種數與所占的比例

Location	Species	Earthworm unique (ASV)	Share with soil (ASV)	Earthworm unique (%)	Share with soil (%)
Zhongshan, Keelung	<i>A. rockefelleri</i>	2322	372	86.2%	13.8%
	<i>M. californica</i>	2575	267	90.6%	9.4%
	sp41	3025	443	87.2%	12.8%
Neihu, Taipei	<i>A. tayalis</i>	2192	676	76.4%	23.6%
	<i>M. trutina</i>	1362	378	78.3%	21.7%
	sp14	1673	558	75.0%	25.0%
Shuangxi, New Taipei	<i>A. incongruus</i>	2341	938	71.4%	28.6%
	<i>A. rockefelleri</i>	1250	902	58.1%	41.9%
Xindian, New Taipei	<i>A. tayalis</i>	1893	649	74.5%	25.5%
	<i>A. lini</i>	3569	877	80.3%	19.7%
	<i>M. trutina</i>	3183	602	84.1%	15.9%
	sp18	4535	1124	80.1%	19.9%

比例以蚯蚓腸道 ASV 種數總和作為分母

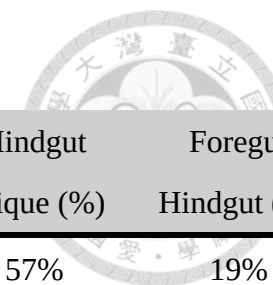


表 13 蚯蚓腸道前、後腸菌相獨有的 ASV 種數與所占比例

Location	Species	Foregut unique (ASV)	Hindgut unique (ASV)	Foregut Hindgut (ASV)	Foregut unique (%)	Hindgut unique (%)	Foregut Hindgut (%)
Zhongshan, Keelung	<i>A. rockefelleri</i>	632	1542	520	23%	57%	19%
	<i>M. californica</i>	1052	1163	627	37%	41%	22%
	sp41	888	1505	1075	26%	43%	31%
Neihu, Taipei	<i>A. tayalis</i>	1252	945	671	44%	33%	23%
	<i>M. trutina</i>	1251	347	142	72%	20%	8%
	sp14	1199	601	431	54%	27%	19%
Shuangxi, New Taipei	<i>A. incongruus</i>	1722	976	581	53%	30%	18%
	<i>A. rockefelleri</i>	710	768	674	33%	36%	31%
Xindian, New Taipei	<i>A. tayalis</i>	884	1182	476	35%	46%	19%
	<i>A. lini</i>	1837	1838	771	41%	41%	17%
	<i>M. trutina</i>	2749	769	267	73%	20%	7%
	sp18	1955	2031	1673	35%	36%	30%

表 14 周界土壤與蚯蚓腸道前、後腸菌相的 ASV 種數

Location	Species	Foregut unique	Hindgut unique	Soil unique	Foregut Hindgut	Hindgut Soil	Foregut Soil	Foregut Hindgut Soil	SUM
Zhongshan, Keelung	<i>A. rockefelleri</i>	578	1325	2937	419	217	54	101	5631
Zhongshan, Keelung	<i>M. californica</i>	971	1079	3042	525	84	81	102	5884
Zhongshan, Keelung	sp41	829	1292	2866	904	213	59	171	6334
Neihu, Taipei	<i>A. taylori</i>	1142	677	2136	373	268	110	298	5004
Neihu, Taipei	<i>M. trutina</i>	937	340	2434	85	7	314	57	4174
Neihu, Taipei	sp14	1038	446	2254	189	155	161	242	4485
Shuangxi, New Taipei	<i>A. incongruus</i>	1580	554	2199	207	422	142	374	5478
Shuangxi, New Taipei	<i>A. rockefelleri</i>	568	439	2235	243	329	142	431	4387
Xindian, New Taipei	<i>A. taylori</i>	739	855	3384	299	327	145	177	5926
Xindian, New Taipei	<i>A. lini</i>	1564	1480	3156	525	358	273	246	7602
Xindian, New Taipei	<i>M. trutina</i>	2377	675	3431	131	94	372	136	7216
Xindian, New Taipei	sp18	1762	1723	2909	1050	308	193	623	8568

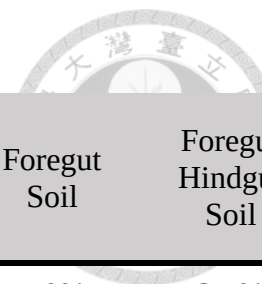


表 15 周界土壤與蚯蚓腸道前、後腸菌相的 ASV 比例

Location	Species	Foregut unique	Hindgut unique	Foregut Hindgut	Hindgut Soil	Foregut Soil	Foregut Hindgut Soil
Zhongshan, Keelung	<i>A. rockefelleri</i>	21.5%	49.2%	15.6%	8.1%	2.0%	3.7%
	<i>M. californica</i>	34.2%	38.0%	18.5%	3.0%	2.9%	3.6%
	sp41	23.9%	37.3%	26.1%	6.1%	1.7%	4.9%
Neihu, Taipei	<i>A. tayalis</i>	39.8%	23.6%	13.0%	9.3%	3.8%	10.4%
	<i>M. trutina</i>	53.9%	19.5%	4.9%	0.4%	18.0%	3.3%
	sp14	46.5%	20.0%	8.5%	6.9%	7.2%	10.8%
Shuangxi, New Taipei	<i>A. incongruus</i>	48.2%	16.9%	6.3%	12.9%	4.3%	11.4%
	<i>A. rockefelleri</i>	26.4%	20.4%	11.3%	15.3%	6.6%	20.0%
Xindian, New Taipei	<i>A. tayalis</i>	29.1%	33.6%	11.8%	12.9%	5.7%	7.0%
	<i>A. lini</i>	35.2%	33.3%	11.8%	8.1%	6.1%	5.5%
	<i>M. trutina</i>	62.8%	17.8%	3.5%	2.5%	9.8%	3.6%

比例以蚯蚓腸道 ASV 種數總和作為分母