

## 第二章 文獻回顧

### 2.1 纖維廢棄物

#### 2.1.1 來源

一般纖維廢棄物主要來源以農作、森林、水產、畜牧等動植物產銷所產生之廢棄物為最大宗，其次為辦公室所產生之廢紙及家庭廚餘，這些廢棄物中大都含有大量之纖維素，若不謹慎處理會造成嚴重之廢棄物污染。以台灣而言，由農業所產生的農業廢棄物數量相當可觀，每年農業廢棄物可產生六百五十四萬公噸(行政院環保署，2002)，居於事業及建築廢棄物之後。

#### 2.1.2 處理方法

現階段對纖維廢棄物之處理方式，多採用掩埋法、焚化法，對於辦公室廢紙則是採資源回收方式。而掩埋法處理所產生之缺點為，當纖維廢棄物掩埋後經生物分解，易產生臭味及掩埋場佔地廣等問題。以焚化法而言，此類廢棄物含較高之濕基，故不利與一般廢棄物共同處理，且在焚化處理過程中，易因燃燒溫度不足產生 CO 及懸浮微粒等物質，且因濕基過高會提高燃料成本，不符合經濟效益。Romana 等學者在 2000 年時，提出以厭氧微生物轉化的方法，將這些纖維廢棄物轉變成生質能源，如甲烷或乙醇等再生能源，而且此種方法可以有效的減少這些固體廢棄物的

污染( Romana and Rajoka, 2000 )。

## 2.2 纖維素之生物轉化

纖維素為農業、林業最主要的廢棄物成份。此外都市廢棄物中之廢紙類，這些廢棄物主要成分為纖維素(cellulose)、半纖維素(hemicellulose)及木質素(lignin)，甚至含有澱粉(starch)、果膠(pentin)等物質(王氏，2006)，這些物質皆可利用生物轉化方式將其分解產生甲烷，提供另一種能源選擇。此種生長處理方式可有效減少固體廢棄物及增加資源的利用性(Yang *et al.*, 2004; Thanakoses *et al.*, 2003; Wyk, 2002)。

纖維素之生物轉化成甲烷的過程，可藉由纖維水解菌群(cellulolytic bacteria)將大分子之纖維素以水解酵素水解成小分子的糖類中間代謝產物如纖維二糖(cellobiose)、葡萄糖(glucose)及纖維糊精(cellodextrins)，再經由醱酵菌群(fermentative bacteria)進一步醱酵，產生乙醇、乙酸、丙酸、丁酸等較小分子之有機酸類，其後酸生成菌將有機酸轉換為氫氣及乙酸，最後甲烷菌進行最後礦化作用(Fig. 2.1)，將簡單之有機酸類及  $H_2/CO_2$  轉化產生甲烷(Irene and Banks, 2005; Leschine, 1995)。

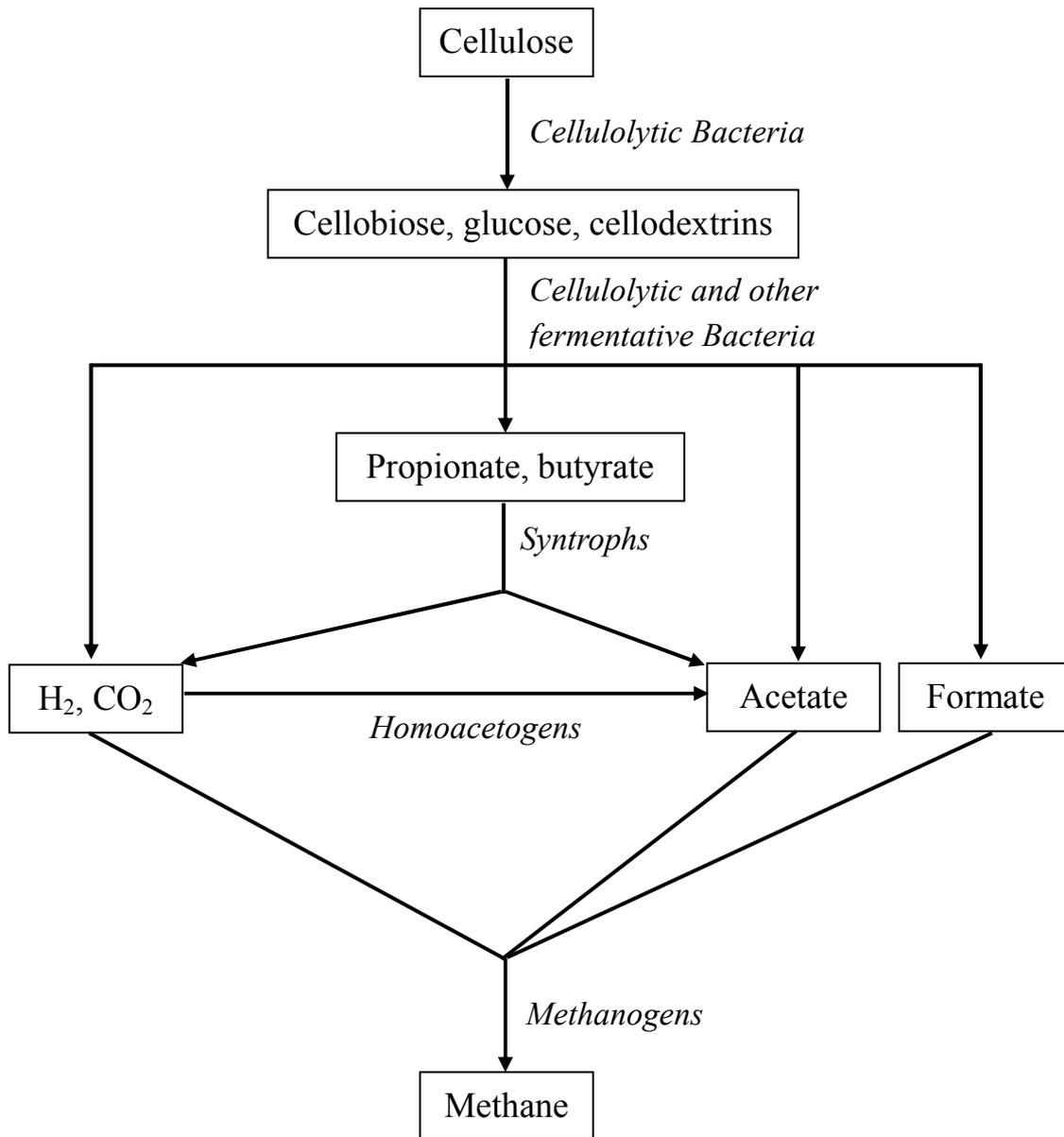


Fig 2.1 Diagram of anaerobic biodegradation of cellulose to methane by microbial communities in soils and freshwater sediments (Leschine *et al.*, 1995).

### 2.3 嗜熱厭氧纖維分解菌

自然界中纖維素為一般微生物不易分解之聚合物，環境中存  
在纖維素之降解，主要靠存在於土壤、湖底或河底沈積物、堆肥、  
牛胃及溫泉等厭氧環境中之纖維分解微生物作用使其分解(王  
氏，2006; Bhat and Bhat, 1997; Leschine, 1995)。因此從草食動物  
糞便中(如牛、羊、馬)也可分離得到纖維分解菌，同時近年也有  
學者由溫泉及堆肥場中成功分離出嗜熱性厭氧纖維分解菌株  
(Ozkan *et al.*, 2001)，嗜熱性厭氧纖維分解菌具有熱穩定性的纖維  
分解酵素，進行堆肥醱酵時，其核心溫度可高達60°C以上，故此  
類嗜熱菌可應用在堆肥醱酵的發展。這些嗜熱性纖維分解菌在降  
解過程中可產生乙醇、及揮發性脂肪酸等物質，當中所產生之乙  
醇更可加以回收純化後，作為生質能源，極具有利用價值。Chen  
和Weimer兩位學者提出，若要將纖維素有效分解，利用纖維素分  
解菌及非纖維分解菌在協同作用下，可達到理想的效果(Chen and  
Weimer, 2001)。Leschine也提出纖維分解所產生之代謝物揮發性  
脂肪酸，可再被其他的共生菌群及甲烷菌群利用，產生甲烷及  
CO<sub>2</sub>。

目前所分離出之中溫及嗜熱厭氧纖維分解菌，以*Clostridium*  
為主要之菌屬，但並非所有*Clostridium*菌株皆有分解纖維素能

力。*Clostridium*為革蘭氏陽性菌且具有孢子之菌屬，該屬中又以*Clostridium thermocellum*可直接將纖維素分解形成乙醇、乙酸、 $H_2$ 及 $CO_2$ ，所產生的代謝物中又以乙醇為主要，故被視為分解纖維素轉換為生質能之代表菌株(王氏，2006；Wiegel, 1991)，此外在*Dictyoglomus*、*Thermoanaerobacter*、*Caldocellulosiruptor*、*Fervidobacterium*、*Thermotoga*、*Anaerocellum*及*Spirochaeta*菌屬中發現有部份菌株也具有纖維降解能力，這些菌株之最佳生長溫度範圍介於55-80°C，最佳生長pH範圍介於7.0-8.1之間。分解纖維素所產生之代謝產物以乙酸、 $H_2$ 及 $CO_2$ 為主，乙醇和乳酸則為次要之代謝產物，當中*Fervidobacterium gondwanense*僅能利用水溶性纖維素(Carboxymethyl cellulose, CMC)，無法直接醱酵固態纖維素產生上述之代謝物。雖然這些菌屬所產生之代謝物中非以乙醇為主，但是以纖維素分解過程中，這些菌株仍然扮演著十分重要之角色。Table 2.1所列為分離之嗜熱性厭氧纖維分解菌株。

Table 2.1 List of thermophilic anaerobic cellulolytic bacteria.

Genus	Species	Optimal temp.	Optimal pH
<i>Clostridium</i>	<i>cellulosi</i>	55-60°C	7.0
	<i>stercorarium</i>	65°C	7.3
	<i>thermocopriae</i>	60°C	7.2
	<i>thermolacticum</i>	65°C	7.2
	<i>thermocellum</i>	60°C	7.0
<i>Caldocellulosiruptor</i>	<i>saccharolyticus</i>	70°C	7.0
	<i>lactoaceticus</i>	68°C	7.0
	<i>kristjanssonii</i>	78°C	7.0
	<i>owensensis</i>	75°C	7.5
<i>Fervidobacterium</i>	<i>gondwanense</i>	65-68°C	7.0
	<i>islandicum</i>	65°C	7.2
<i>Thermotoga</i>	<i>maritime</i>	80°C	7.0
	<i>neapolitana</i>	80°C	7.0
<i>Thermoanaerobacter</i>	<i>cellulolyticus</i>	75°C	8.1
<i>Anaerocellum</i>	<i>thermophilum</i>	72-75°C	7.2
<i>Dictyoglomus</i>	<i>turgidus</i>	72°C	7.1
<i>Spirochaeta</i>	<i>thermophila</i>	70°C	7.0

(Bredholt *et al.*, 1999; Bergquist *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1998; Andrews and Patel, 1996; Wiegel, 1991)

## 2.4 甲烷菌

甲烷菌(Methanogen)屬於古細菌(Archaea)中的 Euryarchaeota 門，也是目前已知古細菌中種類最多的一群。甲烷菌具有各種不同形態、細胞壁結構及代謝機制，但卻是地球上唯一能產生甲烷的菌群。甲烷菌生長在富含有機物且厭氧之環境中，如底泥、河川出海口的沈積物、污水處理廠的厭氧消化槽、動物腸道與反芻動物之瘤胃中(Jiang *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2002)，甚至部份甲烷菌可生長在較極端的環境中如，溫泉口、高鹽及低溫環境下皆可發現它的存在(Jiang *et al.*, 2005；賴氏，2006)。

甲烷菌為一類相當特別的古細菌，能在厭氧環境下利用  $H_2/CO_2$ 、甲酸、乙酸、甲醇等含單碳之化合物(Table 2.2)，並轉換為甲烷之高特異性(specifity)菌種。典型甲烷菌能在厭氧環境下利用乙酸之  $CH_3$  基形成甲烷，僅有少數幾種甲烷菌有能力利用乙酸之羧基(carboxyl group)形成  $CO_2$ 。另外甲烷亦可在厭氧還原程序由  $H_2$  和  $CO_2$  產生，通常由  $H_2$  提供電子，而  $CO_2$  為厭氧呼吸(anaerobic respiration)的電子接受者(Garcia *et al.*, 2000)。甲烷菌可依賴其他厭氧菌所產生之  $H_2$ 、 $CO_2$ 、 $CH_3COOH$  等小分子生長，因此會一同出現在同一環境下，並且有密切之共生關係，此共生關係稱為共營作用(syntrophism)，並且雙方皆獲得利益。甲烷菌

Table 2.2 Reaction and standard changes in free energies for methanogenesis.

Reaction	$\Delta G^0$ (KJ/mol CH <sub>4</sub> )
4 CO + 2H <sub>2</sub> O → CH <sub>4</sub> + 3CO <sub>2</sub>	-211
4 H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> → CH <sub>4</sub> + 2H <sub>2</sub> O	-135.6
4 Formate → CH <sub>4</sub> + 3CO <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	-130.1
2 Ethanol + CO <sub>2</sub> → CH <sub>4</sub> + 2 Acetate	-116.3
Methanol + H <sub>2</sub> → CH <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O	-112.5
4 Methanol → 3CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	-104.9
4 Methylamine + 2H <sub>2</sub> O → 3CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 4NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-75.0
Trimethylamine + 6H <sub>2</sub> O → 9CH <sub>4</sub> + 3CO <sub>2</sub> + 4NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-74.3
2 Dimethylsulfide + 2H <sub>2</sub> O → 3CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> S	-73.8
2 Dimethylamine + 2H <sub>2</sub> O → 3CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 2 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-73.2
4 2-Propanol + CO <sub>2</sub> → CH <sub>4</sub> + 4 Acetone + 2H <sub>2</sub> O	-36.5
Acetate → CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub>	-31.0

(Garcia *et al.*, 2000)

由其他厭氧菌中得到H<sub>2</sub>，乙酸等物質，而其他厭氧菌也因甲烷菌快速將這些代謝物利用掉而有利生長(Reddy et al., 1972)。

#### 2.4.1 嗜熱性甲烷菌(Thermophilic methanogens)

微生物生長速率會隨溫度改變，一般溫度每上升10°C，微生物生長速率即增加一倍，而生長溫度範圍視核酸、蛋白質等巨分子化合物而定(Fujiwara, 2002)。Table 2.3中依最適生長溫度對微生物加以分類，Table 2.4則顯示目前已知之嗜熱性甲烷菌。

依據rRNA基因的演化關係，古細菌可分為Crenarchaeota、Euryarchaeota、Korarchaeota和Nanoarchaeota。Korarchaeota是從美國黃石公園高溫環境下取得樣品，經由16S rRNA分析所區分出的族群，但目前尚無成功分離出純種菌株，與其它物種的關係也尚明確，它們有可能是16S rRNA發生了特殊突變的物種，並不是一個獨立的物種。Nanoarchaeota迄今只包括一個種，由Stetter等人於2002年在冰島的溫泉口發現的*Nanoarchaeum equitans*，為古細菌中新發現的生物(Huber et al., 2002)。

Euryarchaeota門中的甲烷菌，依其生長條件大都為中溫物種，但當中有部份較特殊之甲烷菌是生存在極端的環境下如高

Table 2.3 Classification of microorganism by different optimal growth temperatures.

Type of bacteria	Optimal growth temperature
Psychrophiles	5-20°C
Mesophiles	20-45°C
Thermophiles	45-60°C
Extreme thermophiles	60-80°C
Hyperthermophiles	80-110°C

(Haki and Rakshit, 2003; Niehaus *et al.*, 1999)

Table 2.4 List of thermophilic methanogens.

Genus	Species	Optimal temp.	Optimal pH
<i>Methanothermobacter</i>	<i>thermautotrophicus</i>	65°C	7.2-7.6
	<i>marburgensis</i>	65°C	6.8-7.4
	<i>thermoflexum</i>	55°C	7.9-8.2
	<i>wolfeii</i>	55-65°C	7.0-7.5
	<i>thermophilum</i>	57°C	7.5
	<i>defluvii</i>	60°C	7.0
<i>Methanothermus</i>	<i>fervidus</i>	80-85°C	6.5
	<i>sociabilis</i>	88°C	6.5
<i>Methanothermococcus</i>	<i>thermolithotrophus</i>	60-65°C	5.1-7.5
<i>Methanocaldococcus</i>	<i>jannaschii</i>	85°C	6
	<i>fervens</i>	85°C	6.5
	<i>infernus</i>	85°C	6.5
	<i>vulcanius</i>	80°C	6.5
<i>Methanotorris</i>	<i>igneus</i>	88°C	5.7
<i>Methanoculleus</i>	<i>thermophilicus</i>	55°C	7.0
<i>Methanosarcina</i>	<i>thermophila</i>	50-55°C	6.0-7.0
<i>Methanosaeta</i>	<i>thermophila</i>	55-60°C	6.5-6.7
<i>Methanomethylovorans</i>	<i>thermophila</i>	50°C	6.5
<i>Methanotherix</i>	<i>thermoacetophile</i>	65°C	7.4
<i>Methanopyrus</i>	<i>kandleri</i>	98°C	6.5

(Jiang *et al.*, 2005; Boone, 2001; Kristjansson and Stetter, 1991)

溫、高鹽等環境，它們之所以能生存在這樣的條件是因為古細菌細胞膜成分結構之因素，古細菌的脂肪酸以醚(ether)的結構與甘油分子(glycerol)相接，而脂肪分子上的碳氫鏈是以具有規則分支的isopranyl，構成細胞膜內外雙層的碳氫鏈也可以共價相接形成更穩定的tetraether分子，有利於生存在高溫等極端環境條件下(Madigan and Markink, 2006)。

## 2.5 *Methanobacteriaceae* Family 甲烷桿菌科

甲烷桿菌科*Methanobacteriaceae*為甲烷桿菌目*Methanobacteriales*的成員之一，該甲烷菌族群對基質的利用、形態、脂質組成和rDNA序列有別於其它甲烷菌。*Methanobacteriales*普遍為嗜氫的族群，使用H<sub>2</sub>還原CO<sub>2</sub>形成甲烷(methane)，但也有部份菌株可利用二級醇類(secondary alcohols)當作電子提供者(electron donors)將CO<sub>2</sub>還原為甲烷。細胞壁結構主要是偽胞壁質(pseudomurein)，且細胞膜的組成包含caldarchaeol和myo-inositol。*Methanobacteriales*目又可分為兩個科(family)，分別為*Methanobacteriaceae*及*Methanothermaceae* (Boone, 2001)，在厭氧污泥消化樣品中以*Methanobacteriaceae*的族群最為常見。

*Methanobacteriaceae*包含四個屬，分別為*Methanobacterium*、*Methanobrevibacter*、*Methanosphaera*和

*Methanothermobacter*。這些菌屬皆為絕對厭氧菌，能利用 $H_2/CO_2$ 作為生長基質，少部份菌種也可利用甲酸(formate)或CO為基質，這些菌屬普遍存在自然界中，但仍有少數的菌屬存在於溫度高於 $70^\circ C$ 的系統中(Skerman *et al.*,1980)。*Methanobacterium*形態為桿菌，最佳生長溫度範圍從 $37-45^\circ C$ ，能量來源是以 $H_2$ 為電子提供者，還原 $CO_2$ 方式獲得能量，此外部份菌株也可利用甲酸、二級醇及CO，並以氨氮(ammonia)進行脫氮作用(denitrogen)作為氮源的來源，及以硫化物當作硫源。*Methanobrevibacter*形態為橢圓形桿菌、球菌或短桿菌，通常以成對或成鏈狀(chains)出現，最佳生長溫度範圍從 $37-40^\circ C$ ，生長及能量來源是以 $H_2$ 還原 $CO_2$ 方式獲得，有時也可利用甲酸作為電子提供者， $NH_4^+$ 為主要細胞之氮源，維他命B化合物為菌株生長之必需生長因子。*Methanosphaera*為球形細胞，通常以成對、四個細胞聚合(tetrads)或以群聚(clusters)現象出現，且休眠的細胞會以類似孢子(spore)型態存在，最佳生長溫度接近 $37^\circ C$ ，生長及能量來源是以1 mole  $H_2$ 原還1 mole 甲醇形成1 mole的 $CH_4$ ，並以 $NH_4^+$ 或胺基酸(amino acid)作為細胞之氮源，維他命B可刺激菌株的生長，但部份菌株生長需要維他命B。*Methanothermobacter*形態為彎曲瘦長桿菌，在 $55-65^\circ C$ 時可快速生長，生長及能量來源是以 $H_2$ 還原 $CO_2$ 方式獲得，且可以原素硫

(sulfur)還原成硫化物(sulfide)，但此反應並無能量產物提供生長，以氨氮(ammonia)作為氮源的唯一來源，及以硫化物當作硫源(Boone, 2001; Bhatnagar *et al.*, 1984)。Table 2.5所列為此四菌屬目前成功分離之菌株特性。

## 2.6 *Methanothermobacter* 屬甲烷菌

*Methanothermobacter* 為 *Methanobacteriaceae* 中之嗜熱性甲烷菌屬，目前共有六個種(species)，分別為 *M. thermautotrophicus*、*M. defluvii*、*M. marburgensis*、*M. thermoflexus*、*M. thermophilus* 及 *M. wolfeii*，其最佳生長溫度均介於 55-65°C 之間。

### 2.6.1 *Methanothermobacter thermautotrophicus*

分離來源由嗜熱污泥消化槽中分離得到。細胞形態為瘦長不規則彎曲桿菌，大小 $0.35-0.6 \times 3-7 \mu\text{m}$ ，具有filament長度約10-120  $\mu\text{m}$ ，屬革蘭氏陽性菌，細胞壁由偽胞壁質(pseudomurein)組成。可代謝 $\text{H}_2/\text{CO}_2$ 為基質。細胞生長不需任何有機生長因子，最佳生長溫度為65°C，最佳生長pH為7.2-7.6，對氯化鈉耐受濃度為0.01-0.5 M。G+C mol%為52或49<sup>Tm</sup> (Zeikus and Wolfe, 1972)。

Table 2.5 Some characteristics of methanogenic archaea of Family *Methanobacteriaceae*.

Organism	Dimensions ( $\mu\text{m}$ )		Optimal growth conditions		
	width	length	pH	Temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	Requires organic growth factors
<i>Methanobacterium</i>					
<i>formicum</i>	0.4-0.8	2-15	7.0-7.5	30-45	None
<i>alcaliphilum</i>	0.5-0.6	2-25	8.0-9.0	37	YE, P
<i>bryantii</i>	0.5-1.0	10-15	6.5-7.5	30-45	None
<i>congolense</i>	0.4-0.5	2-10	7.2	37-42	None
<i>espanolense</i>	0.8	3-9	5.0-6.5	30-45	nd
<i>ivanovii</i>	0.5-0.8	1-15	7.0-7.5	30-45	None
<i>oryzae</i>	0.3-0.4	3-10	7.0	40	None
<i>palustre</i>	0.5	2.5-5	6.5-7.5	30-45	None
<i>subterraneum</i>	0.1-0.15	0.6-1.2	7.8-8.8	20-40	None
<i>uliginosm</i>	0.2-0.6	1.9-3.8	5.0-7.5	30-45	None
<i>Methanobrevibacter</i>					
<i>ruminantium</i>	0.7	0.8-1.7	6.3-6.8	37-39	Ac, B-vit, CoM, 2-MBA, AAs
<i>acididurans</i>	0.3-0.5	0.3-0.5	6.0	35	RF, Ac, AAs
<i>arboriphilus</i>	0.5	1.2-1.4	7.5-8.0	30-37	B-vit
<i>curvatus</i>	0.34	1.6	7.1-7.2	30	Complex
<i>cuticularis</i>	0.4	1.2	7.7	37	None
<i>filiformis</i>	0.2-0.28	4.0	7.0-7.2	30	YE
<i>gottschalkii</i>	0.7	0.9	7.0	37	Ac and/or YE (TP)
<i>oralis</i>	0.4-0.5	0.7-1.2	6.9-7.4	35-38	Fecal extract
<i>smithii</i>	0.6-0.7	~1	6.9-7.4	39	Ac, B-vit
<i>thaueri</i>	0.5	0.6-1.2	7.0	37	Ac and/or YE (P)
<i>woesei</i>	0.6	1.0	7.0	37	Ac and/or YE (P)
<i>wolinii</i>	0.6	1.0-1.4	7.0	37	Ac and/or YE (P)
<i>Methanosphaera</i>					
<i>stadtmanae</i>	~1	~1	6.5-6.9	30-40	Thinamine, Ac
<i>cuniculi</i>	0.6-1.2	0.6-1.2	6.8	35-40	Ac

Table 2.5 Some characteristics of methanogenic archaea of Family *Methanobacteriaceae*. (Continue)

Organism	Dimensions ( $\mu\text{m}$ )		Optimal growth conditions		
	width	length	pH	Temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	Requires organic growth factors
<i>Methanothermobacterium</i>					
<i>thermautotrophicus</i>	0.35-0.6	3-7	7.2-7.6	65	None
<i>defluvii</i>	0.4	3-6	7.0	60	CoM
<i>marburgensis</i>	0.4-0.6	3-6	6.8-7.4	65	None
<i>thermoflexus</i>	0.4	7-20	7.9-8.2	55	CoM
<i>thermophilus</i>	0.36	1.4-6.5	7.5	57	ConM, nd
<i>wolfeii</i>	0.4-0.6	2.5-6.0	7.0-7.5	55-65	nd

Abbreviations: nd, not determined; AAs, mixture of amino acids; Ac: acetate; B-vit, B vitamins; YE, yeast extract; P, peptone; CoM: coenzyme M; Complex, complex nutritional (rumen fluid and nutrient broth); 2-MBA, 2-methylbutyric acid; RF, rumen fluid and TP, trypticase peptones.

(Boone, 2001; Kotelnikova *et al.*, 1993a; Joblin *et al.*, 1990; Blotevogel and Fischer., 1988; Winter *et al.*, 1985; Zeikus and Wolfe., 1972)

### 2.6.2 *Methanothermobacter defluvii*

分離來源由厭氧污泥消化槽中分離得到。細胞形態為瘦直或彎曲桿菌，大小  $0.4 \times 3-6 \mu\text{m}$ ，不具有 filament，屬革蘭氏陰性菌，可代謝  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  及甲酸為基質，細胞生長需要 coenzyme M。最佳生長溫度為  $60^\circ\text{C}$ ，最佳生長 pH 為 7.0，對氯化鈉耐受濃度為 0.01-0.34 M。G+C mol% 為  $62.2^{\text{Tm}}$  (Kotelnikova *et al.* 1993a)。

### 2.6.3 *Methanothermobacter marburgensis*

分離來源由中溫厭氧污泥消化槽中分離得到。細胞形態為彎曲桿菌，大小  $0.4-0.6 \times 3-6 \mu\text{m}$ ，具有 filament 長度可達到  $20 \mu\text{m}$ ，屬革蘭氏陽性菌，可代謝  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  為基質，當有乙酸存在時會以乙酸作為細胞之碳源。細胞生長不需任何有機生長因子。最佳生長溫度為  $65^\circ\text{C}$ ，最佳生長 pH 為 6.8-7.4，對氯化鈉耐受濃度為 0.01-0.5 M。G+C mol% 為  $47.6^{\text{Tm}}$  (Wasserfallen *et al.*, 2000)。

### 2.6.4 *Methanothermobacter thermoflexus*

分離來源由厭氧污泥消化槽中分離得到。細胞形態為彎曲桿菌，大小  $0.4 \times 7-20 \mu\text{m}$ ，具有 filament，屬革蘭氏陽性菌，可代謝  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  及甲酸為基質，細胞生長需要 coenzyme M。最佳生長溫度為  $55^\circ\text{C}$ ，最佳生長 pH 為 7.9-8.2，對氯化鈉耐受濃度為 0.02-0.5 M。G+C mol% 為  $55^{\text{Tm}}$  (Kotelnikova *et al.* 1993a)。

### 2.6.5 *Methanothermobacter thermophilus*

分離來源由嗜熱厭氧污泥消化槽中分離得到。細胞形態為瘦長不規則彎曲桿菌，大小  $0.36 \times 1.4-6.5 \mu\text{m}$ ，具有 filament 長度可達到  $30 \mu\text{m}$ ，屬革蘭氏陰性菌，可代謝  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  為基質，細胞生長需要 coenzyme M。未有文獻指出其它生長因子如乙酸、yeast extract 及 peptone 是否會造成影響。最佳生長溫度為  $57^\circ\text{C}$ ，最佳生長 pH 為 7.5。G+C mol% 為  $44.7^{\text{Tm}}$  (Laurinavichus *et al.*, 1988)。

### 2.6.6 *Methanothermobacter wolfeii*

分離來源由污泥和河床沈積積的混合物質中分離得到。細胞形態為桿菌，大小  $0.4-0.6 \times 2.5-6 \mu\text{m}$ ，具有 filament 長度，屬革蘭氏陽性菌。可代謝  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  為基質。未有文獻指出其它生長因子如 coenzyme M、yeast extract 及 peptone 是否會對其生長造成影響。最佳生長溫度為  $55-65^\circ\text{C}$ ，最佳生長 pH 為 7.0-7.5，對氯化鈉耐受濃度可達到 0.2 M。G+C mol% 為  $61^{\text{Tm}}$  (Winter *et al.*, 1985)。

## 2.7 微生物多樣性探討

### 2.7.1 微生物分類法

為了了解菌群的變化，選擇菌群的分類方法是重要的步驟，如此才能將系統內複雜的菌群有效地分類，以助進一步分析。傳統的細菌分類方法，主要以細胞的形態特徵、生理特性、生化特性與化學分類等特徵加以分類。但是微生物種類非常複雜，單靠外形及生長環境等特性是無法有效地區分，必須仰賴生化測試，然而自然界中約有 99% 的微生物是無法培養的，只有小部份的微生物可藉傳統的純菌分離培養方式分離，故利用傳統的分類方式進行菌群研究並非適當(Muyzer, 1999; Amann *et al.*, 1995)。

### 2.7.2 分子分類學

近年來隨著分子生物技術的發展，分子序列分析可不經由培養而直接進行分析，有效解決傳統方法無法明確分類及菌群無法培養的缺點。其中，核糖體核酸(ribosomal RNA, rRNA) 因具備了普遍性、高度保守性、演化速率慢及基因直接表現於生化特性上，故可提供足夠的分類訊息，因此，對於研究親緣關係及菌種鑑定，是很好的演化及分類依據(Kazuya *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2000)。

核糖體為細胞中一種小型顆粒狀的物質，其功能為合成蛋白質。核糖體由兩個次單元(subunits)所組成，分別為小次單元、大次單元(small subunit and large subunit)。在原核生物中，大次單元是由34種蛋白質和5S rRNA(約120 bp)及23S rRNA(約3.0 Kbp)所組成，小次單元則由21種蛋白質及16S rRNA(約1.5 Kbp)所組成(Olsen *et al.*, 1986)。

曾有學者依據 5S rRNA 核酸序列作為物種的依據，但由於其所具備的核酸序列太短，差異性過小，易造成分類上誤差。而 23S rRNA 的序列則太長，雖然提供足夠的演化訊息，但也由於其序列太長，需要耗費更多的時間與金錢進行定序，因此較少被用於物種分類上。而 16S rRNA 的核酸序列長短適中，適合作為分類學上的研究，其序列資料庫也較齊全，因此目前微生物多樣性的研究主要以 16S rRNA 來進行分類(Kazuya *et al.*, 2001)。Fig. 2.2 為 16S rRNA gene 之二級結構圖，可清楚看出 16S rRNA gene 中保守性的 universal 區段及變異性的 variable 區段，這些區段皆可作為分子分類學上之依據(廖氏，2004)。

### 2.7.3 分子分類方法

以傳統培養方式分析微生物族群之方法，主要以顯微鏡觀察菌相形態或使用菌種分離等方式。但細菌之外形差異性不大，因

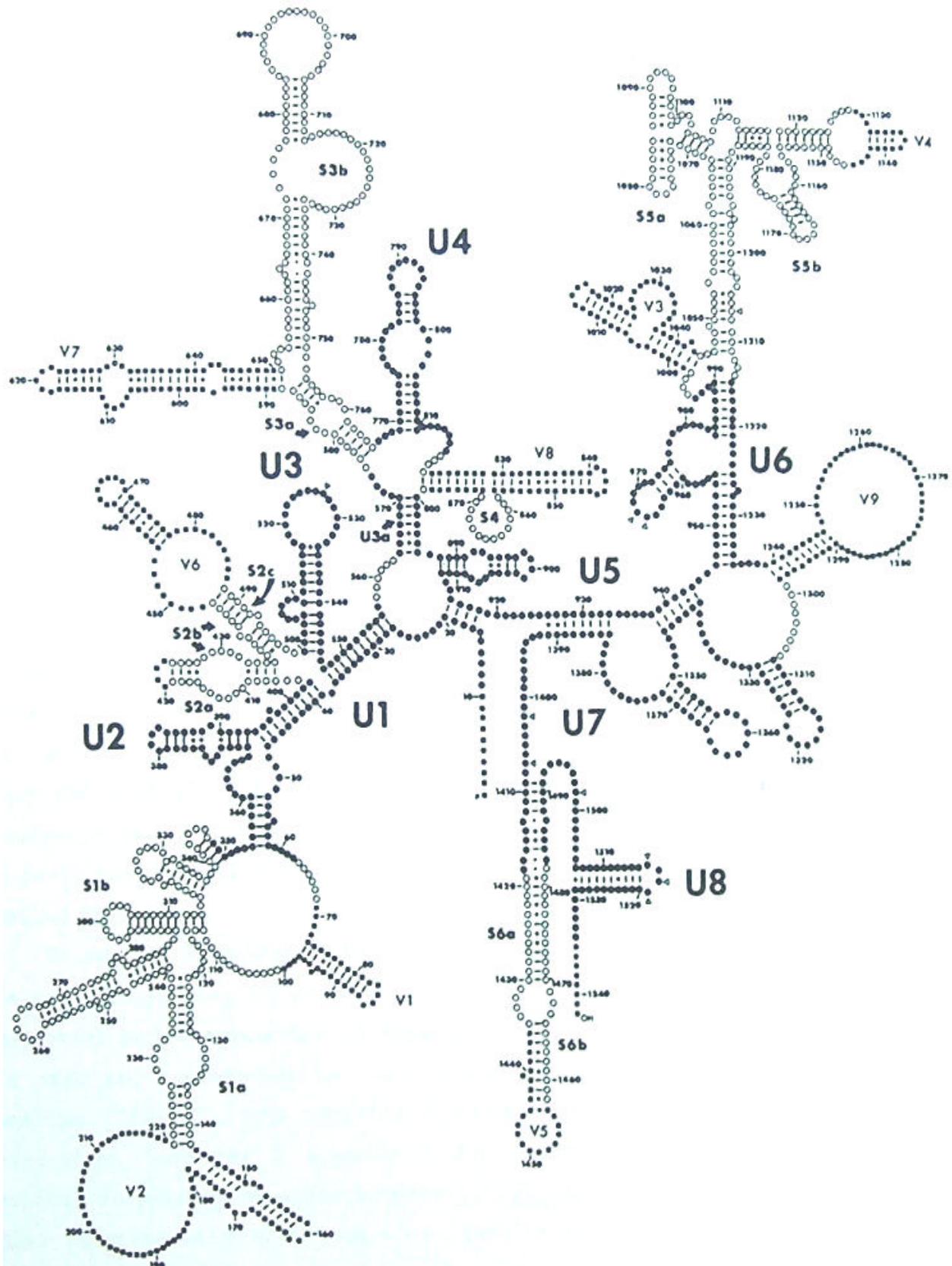


Fig. 2.2 Structure of the universal (U1-U8) and variable regions in the SSU rRNAs (Gray *et al.*, 1984) ◦

此無法依菌體外形作有效的分類。使用菌種分離法，則會因培養基具有選擇性，而無法完全分離出來。而且培養方式所需分析時間長，故不利於環境樣品之菌相分析。而分子生物技術的發展，正可彌補傳統培養方法的缺點，目前所發展出之技術如聚合酶連鎖反應(PCR)、變性梯度凝膠電泳(DGGE)、限制酵素片段多型性(RFLP/T-RFLP)、螢光原位雜交(FISH)、Cloning 等方式，利用各種分子生物技術的結合達到菌群結構分析之目的(Wu *et al.*, 2001; 黃氏等, 2005)。

#### 2.7.3.1 聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)

PCR 反應主要是使用引子、四種去氧核苷三磷酸(dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP)、鎂離子及 DNA 聚合酵素等反應物混合後，再利用熱循環儀器反覆進行變性(Denaturation)、引子黏合(Annealing)、延展(Extension)三程序。依此模式，便可將目標 DNA 以  $2^n$  倍數擴增，因此，目標 DNA 之量便成為原先的好幾百萬倍，因此特定之 DNA 片段便可輕易的被偵測出。PCR 已應用於許多領域之研究，包括基因定序、演化分析、遺傳疾病檢驗及食品病原菌之快速檢測，目前是環境微生物多樣性及菌群消長之相關研究的重要工具。

### 2.7.3.2 變性梯度凝膠電泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

菌落指紋譜(Community Fingerprinting)是指一混合菌群之DNA片段經電泳後所呈現之分布情形。電泳，是指在膠片中通入一電場，DNA本身帶負電，利用正負電相吸引的方式，引導DNA在膠片中往正電場方向移動，而膠片本身為一種網狀結構物質，依DNA分子量大小及不同變性程度之DNA在膠片上移動速度的不同，因此，可據此將混合菌種逐一分離。且DGGE的靈敏度可高達95%，故在最佳分析條件下，幾乎可將所有菌種之DNA片段分離，也因此，可將指紋譜上所分離出之亮帶(band)視為一操作分類單元(Operational taxonomic unit, OTU)(Hill *et al.*, 2000; Kazuya *et al.*, 2001)。

DGGE基本原理是進行PCR過程中，先將forward端或reverse端加上一個30到50個全部由G或C鹼基所組成的GC-clamp，其作用為了防止雙股DNA因鹼性變性梯度造成完全開鏈成為單股DNA，此現象會降低核酸序列在電泳過程中的解析能力。經PCR後所得之產物，利用在膠片中之變性成份將雙股DNA變性，再依相同片段但序列不同的PCR產物在膠片中泳動，因變性程度的差異造成泳動率不同，達到混合菌株之序列分離。DNA為一雙股結

構，是由兩單股DNA藉由相互補的鹼基形成氫鍵結合而成，A與T是以兩個氫鍵鍵結，G與C則是以三個氫鍵鍵結，當加入尿素等變性物質可促使DNA之氫鍵打斷，但因A、T、C、G之間的結合力不同之因素，使得變性程度隨之不同，而不同菌種之序列A、T、C、G 鍵結位置及含量不同，使雙股DNA遭到開鏈程度及形狀也不相同，故不同之序列通過網狀結構的難易度便因而不同，所停留的位置也就不同，若在電泳過程中在膠片中加上變性梯度，則可使這種差異性加大，降低不同菌種但有相同變性程度的機率(Muyzer, 1999)。Fig. 2.3為DGGE示意圖，變性梯度由高至低及雙股核酸變性情況。

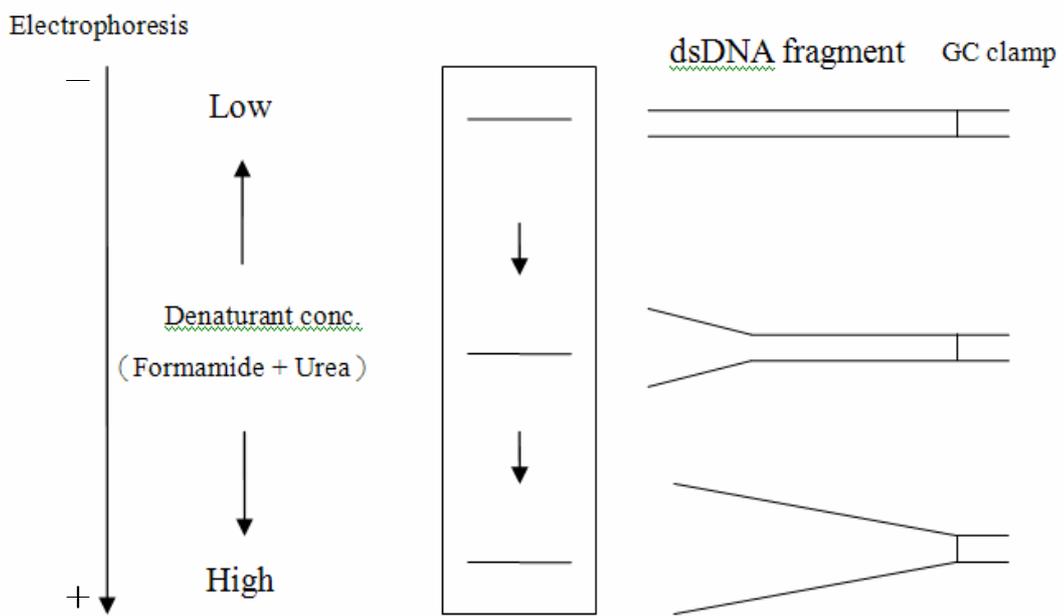


Fig. 2.3 Schematic diagram of denaturing gradient gel electrophoresis (廖氏，2004).