

第三章 實驗材料與方法

3.1 實驗流程設計

本研究是針對實驗室中所培養出之纖維素降解混合菌群，探討其中的真細菌(eubacteria)與古細菌(archaea)兩大族群的分佈，進一步從古細菌族群中成功分離出一株嗜熱性甲烷菌，深入探討其生長之參數及利用分子生物技術鑑定該菌株之親緣關係。本研究之實驗流程圖如 Fig. 3.1。

3.2 混合菌種來源

本研究所使用之混合菌種是由中台灣某廢紙回收廠廢水樣本做為殖種來源，取回實驗室中所培養出之嗜熱性厭氧纖維降解批次實驗菌群。批次培養方式是使用 250 ml 的三角錐形瓶，加入 90 ml 的嗜熱厭氧培養基和 10 ml 的菌液，在厭氧條件中，以 α 纖維素作為碳源，培養在 70°C 下。

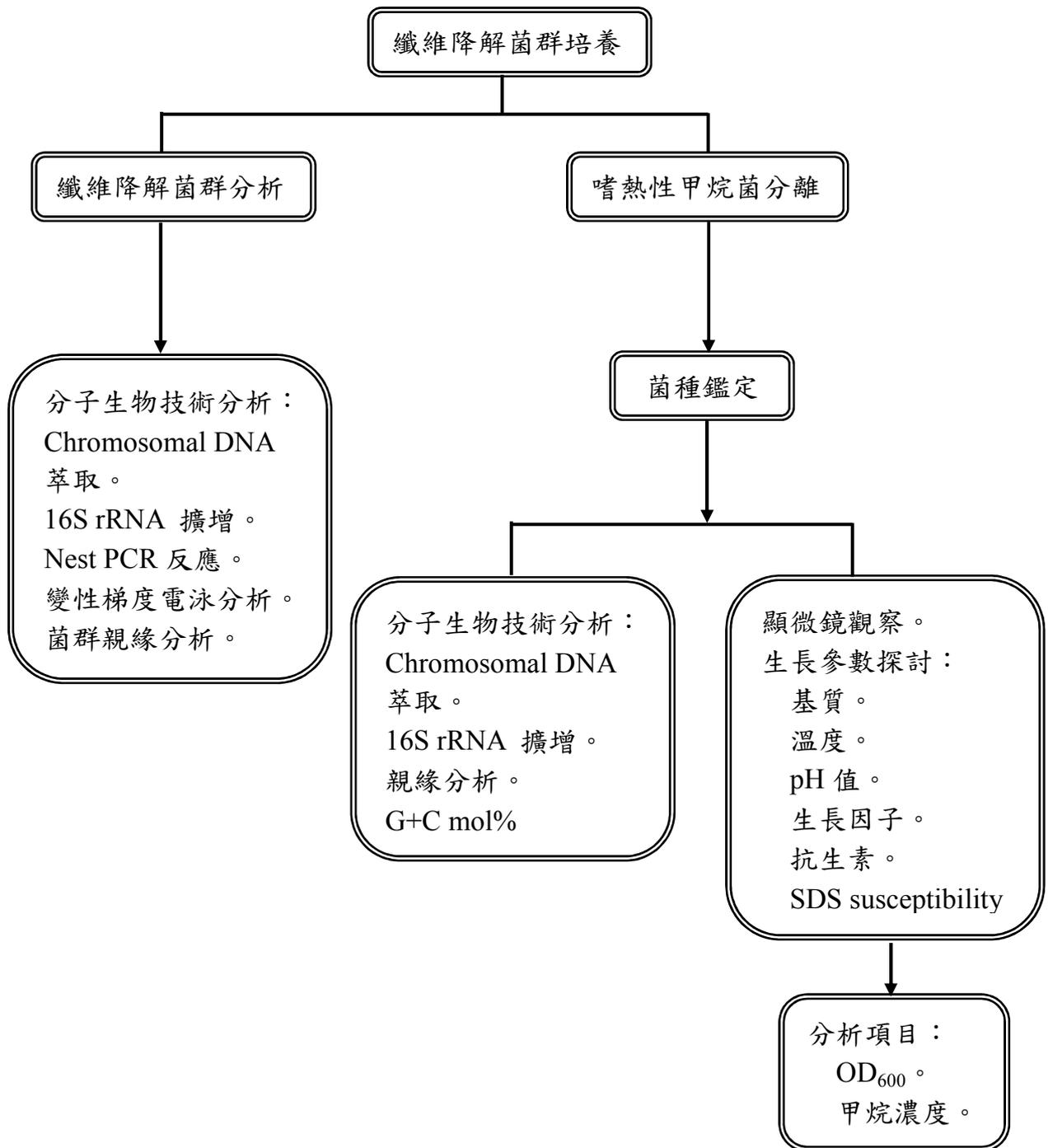


Fig. 3.1 Flow chart of experimental design in this study.

3.3 菌種培養

3.3.1 嗜熱厭氧培養基

嗜熱厭氧培養基(thermophilic anaerobic medium, TA medium)(Huang *et al.*, 1998)為在厭氧操作程序下進行配製，其成份如 Table 3.1 所示，並加入微量元素。操作步驟如下：先取 1 L 去離子水置入圓底燒瓶中，放入 2~3 顆沸石，分別加入 1 ml Trace elements(10X)，0.4 g K_2HPO_4 ，0.0005 g Resazurin (氧化還原指示劑)，0.05 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ，0.1 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ，1 g $(NH_4)Cl$ 。圓底燒瓶瓶口處通入氮氣之情況下煮沸，使其降低培養基中的溶氧，待培養基溫度降至接近室溫時，依序加入 L-cysteine 及 $NaHCO_3$ ，此時改通以混合氣($N_2/CO_2 = 80\%/20\%$)，並加以混合，由於培養基成份中含有 Resazurin 為氧化還原指示劑（有氧狀態為粉紅色；無氧狀態為透明無色）。故加入 L-cysteine 及 $NaHCO_3$ 後會稍微呈現粉紅色，所以須靜置到透明無色，再分裝入 120 ml 的通氣血清瓶中，最後使用丁基橡膠塞塞住瓶口再以鋁蓋封瓶，維持厭氧狀態，再以高溫高壓滅菌釜進行滅菌（ $121^\circ C$ 、1.5 倍大氣壓，滅菌 15 分鐘）。

Table 3.1 Component of TA medium.

Component	Content	Source
Carbon source		
α -Cellulose	2.0 g/L	Sigma
Trace element solution ¹	10.0 ml	
K_2HPO_4	0.40 g	Riedel-deHaën
Resazurin	0.0005 g	Sigma
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.05 g	Riedel-deHaën
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.10 g	Riedel-deHaën
$(NH_4)Cl$	1.00 g	Riedel-deHaën
L-Cysteine	0.50 g	Sigma
$NaHCO_3$	3.90 g	Riedel-deHaën
*Vitamin solution ²	10 ml	
* $Na_2S \cdot 9H_2O$	0.25 g	Riedel-deHaën
*Peptone	1.0 g/L	Difco
*Yeast extract	1.0 g/L	Difco
Dist. H_2O	add to 1000 ml	

¹ : 微量元素成分如 Table 3.2

² : 維他命溶液成分如 Table 3.3

* : 殖菌前加入

Table 3.2 Components of trace element solution of TA medium.

Component	Content	Source
conc. HCl [*]	1.0 ml	Riedel-deHaën
NiCl ₂	0.05 g	Riedel-deHaën
EDTA ^{**}	0.50 g	Riedel-deHaën
H ₃ BO ₃	0.05 g	Riedel-deHaën
FeCl ₂ · 4H ₂ O	2.00 g	Riedel-deHaën
CuCl ₂	0.03 g	Riedel-deHaën
ZnCl ₂	0.05 g	Riedel-deHaën
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.05 g	Riedel-deHaën
MnCl ₂	0.05 g	Riedel-deHaën
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.05 g	Riedel-deHaën
AlCl ₃	0.05 g	Riedel-deHaën
Na ₂ SeO ₃ · 5H ₂ O	0.10 g	Riedel-deHaën
Dist. H ₂ O	add to 1000 ml	

*: add HCl to some water first.

**: EDTA should be added after all other components.

Table 3.3 Components of vitamin solution of TA medium.

Component	Content	Source
Biotin	2.0 mg	Sigma
Thiamine-HCl	5.0 mg	Sigma
Pyridoxine-HCl	10.0 mg	Sigma
Nicotinic acid	5.0 mg	Sigma
Riboflavin	5.0 mg	Sigma
Vitamin B ₁₂	0.1 mg	Sigma
DL-Ca-pantothenate	5.0 mg	Sigma
Lipoic acid	5.0 mg	Sigma
P-aminobenzoic acid	5.0 mg	Sigma
Folic acid	2.0 mg	Sigma
Dist. H ₂ O	add to 1000 ml	

3.3.2 Hungate 除氧系統

本研究的菌群及嗜熱性甲烷菌的培養是以 Hungate (Hungate, 1969)方式來進行培養。該方式去氧的做法是利用 Hungate gas station (Fig 3.2)，以加熱包加熱放在其中的玻璃管，並在玻璃管中填入銅絲，當加熱包加熱至 250-270°C 時，可將氣體鋼瓶中殘存的氧氣與銅絲結合，形成氧化銅(CuO)，達到無氧狀態。每次操作加氣站時，必需在 250°C 的高溫下通入氫氣，還原氧化銅，使玻璃管中的銅絲仍保有與氧結合的能力。

3.3.3 纖維降解菌群培養

將事先配製好的 45 ml TA medium(內含 2 g/L 的 α 纖維素)，加入 0.5 ml 之 Na_2S (100X)、0.5 ml 之 yeast extract (100X)、0.5 ml 之 peptone (100X)和 0.5 ml 之維他命溶液(100X)，最終濃度為 0.25 g/L Na_2S 、1 g/L yeast extract、1 g/L peptone 和 1X 維他命溶液，再殖入 5 ml 的菌液後置入 70°C 培養箱中培養。培養過程中每天監測瓶頂空間甲烷產生量，並每兩天取出 10 ml 的菌液，作為菌群分析之用。

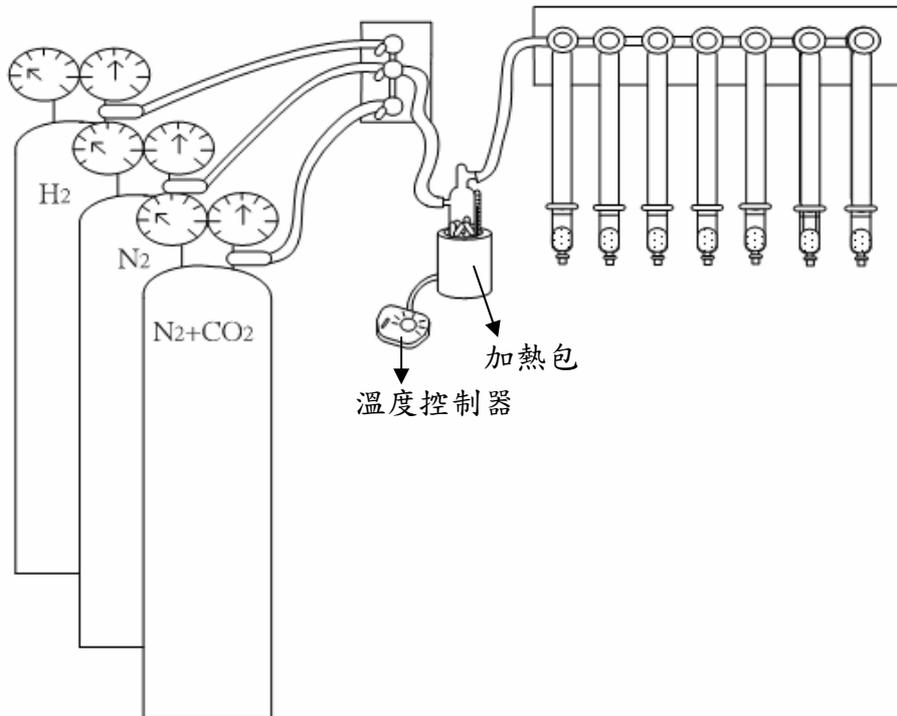


Fig. 3.2 Schematic diagram of Hungate gas station.

3.4 嗜熱性纖維素降解菌群分析

3.4.1 DNA 萃取方法

參考 Liu 氏等抽取活性污泥之 DNA 方法(Liu *et al.*, 1997)。

取 10 ml 菌液置入微量離心管中，以 13,000 rpm 離心 10 分鐘後去上層液，加入 500 μ l solution I (含有 20 mg/ml lysozyme, 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0))，置於 37°C 反應 30 分鐘，其目的在藉由酵素催化水解細胞壁。加入 10 μ l 的 proteinase K (10 mg/ml) 和 25 μ l 的 20% SDS，於 37°C 反應 30 分鐘，其目的為在使蛋白質變性。進行三次冷凍(-70°C，冷凍 10 分鐘)/解凍(70°C，解凍 10 分鐘)循環，使細胞壁破壞更完全。加入 10 μ l 的 RNase (10 mg/ml) 於 37°C 反應 30 分鐘，其目的為去除 RNA，反應完後，以 13,000 rpm 離心 10 分鐘後取上層液。加入等量之 phenol/chloroform-Isoamyl alcohol 溶液(25:24:1)，與萃取液混合後 13,000 rpm 離心 10 分鐘後取上層液，加入等量之 chloroform-Isoamyl alcohol 溶液(24:1)，與萃取液混合後 13,000 rpm 離心 10 分鐘後取上層液，目的為去除殘餘的 phenol。加入 1/5 倍 7.5 M 的 ammonium acetate 和 2.5 倍 100% 的乙醇，放入 -70°C 冷凍 1 小時後，以 13,000 rpm 離心 10 分鐘後去上層液，加入 1 ml 的 70% 乙醇，以 13,000 rpm 離心 10 分鐘後去上層液，其目的

為去除殘餘的鹽類。自然風乾後，加入 50 μl 的 70°C 無菌水溶解 DNA。

3.4.2 萃取之 DNA 產物檢視

以 1×TAE buffer (50倍TAE buffer 中含有 242g/L Tris base, 57 ml/L acetic acid, glacial, 100 ml/L 0.5 M EDTA(pH 8.0)) 配製 1% Agarose gel (洋菜膠體)，將 gel 置於含 1×TAE buffer 之水平電泳槽。取 5 μl 的 DNA 萃取產物與 1 μl 的 6×loading buffer 混合均勻後注入洋菜膠體，並以 λ DNA marker 作為標記，在 100 volt 下進行 30 分鐘電泳。電泳結束後將洋菜膠體取出置於 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 ethidium bromide 溶液中染色 5 分鐘並浸泡於去離子水中退染 10 分鐘，以 254 nm 紫外燈觀察 DNA 亮帶，並使用照相系統存取結果。

3.4.3 DNA 的純度及定量檢測

利用 UV 分光光度計 (Shimadzu, UVmini-1240)，以波長 260 nm 及 280 nm 的吸收波長記錄吸光值，而一般 260 nm 為 DNA 的最大吸收波長。在檢驗純度時則是以 A_{260}/A_{280} 的比值做為判斷的依據，一般 A_{260}/A_{280} 比值大於 1.8 至 2.0 以上，可視為較佳的 DNA 純度範圍。DNA 濃度計算可由下列式子計算得到：

$$50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times \text{OD}_{260} \text{ of the sample} = \text{concentration of DNA } (\mu\text{g}/\text{ml})$$

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

聚合酶連鎖反應是種將目標 DNA 片段擴增的方法，此方法是先選擇或設計一組引子(primer)，而所謂的引子就是與預擴增的 DNA 片段相互補的寡核苷酸(oligonucleotides)，此引子的選擇將會影響到 PCR 產物的專一性。整個 PCR 反應主要是使用引子、四種去氧核苷三磷酸(dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP)及 DNA 聚合酶等反應藥劑混全後，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 倍數增加。PCR 反應條件中引子黏合溫度和 Mg^{2+} 濃度十分重要，這兩個因子將影響 PCR 產物的專一性和聚合酶的活性，因此必須調整到最佳的引子黏合溫度和 Mg^{2+} 濃度。本研究使用分別針對真細菌(Eubacteria)引子 27F/1522R 及古細菌(Archaea)引子 A23F/A1391R(引子序列如 Table 3.4)，將混合菌群的 16S rDNA 擴增後，再以真細菌 nested PCR 引子 341fGC/926R 和古細菌 nested PCR 引子 A934F/U1391RGC 針對兩族群之 V3-V5 變異區間再進行擴增，此方式可提高之後對菌相分析的準確性，而且也因受限於變性梯度電泳分析之片段長度，故必須進一步進行 nested PCR 反應。反應試劑如 Table 3.5 及 3.6 所示。PCR 反應溫度設定為 $94^{\circ}C$ /5 分鐘

Table 3.4 PCR primers for amplification of 16S rDNAs (W=A, T; M=A,C; Y=C, T; R=A,G).

Primer	Specificity	Target sequence site (5'-3')
27F	Bacteria	AGCGTTTGATCMTGGCTCAG
1522R	Bacteria	AAGGAGGTGWTCCARCC
A23F	Archaea	GCGGATCCGCGGCCGCTGCAGAYCTGGTYG ATYCTGCC
A1391R	Archaea	GACGGGCGGTGTGTRCA
341fGC*	Bacteria	CGCCCGCCGCGCGCGGCCGGGGCGGGGG CACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG
926R*	Bacteria	CCGTCAATTCTTTGAGTTT
A934F*	Archaea	AGGAATTGGCGGGGGAGCA
U1391RGC*	Universal**	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGG GGGCACGGGGGGGACGGGCGGTGTGTR CA
coccus 1	Methanogen	CGACTAAGCCATGCGAGTC
reverse 3	Methanogen	GTGACGGGCGGTGTGTGCAAG

*: nested PCR primer.

** : Specific for two domains, Bacteria and Archaea.

(Wu *et al.*, 2005; Baker *et al.*, 2003; Haruta *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2001;
Susan *et al.*, 1994)

Table 3.5 The reaction mixtures of PCR.

Components	Volume	Final Concentration	Source
10X PCR buffer	2.5 μ l	1X (contain 1.5 mM Mg ²⁺)	PROTECH
dNTP mix (10 mM of each)	0.5 μ l	200 μ M of each dNTP	PROTECH
27F (10 pmole / μ l)	1.0 μ l	0.4 μ M	MWG-Biotech
1522R (10 pmole / μ l)	1.0 μ l	0.4 μ M	MWG-Biotech
A23F (10 pmole / μ l)	1.0 μ l	0.4 μ M	MB
A1931R (10 pmole / μ l)	1.0 μ l	0.4 μ M	MB
coccus 1 (10 pmole / μ l)	1.0 μ l	1.0 μ l	MB
reverse 3 (10 pmole / μ l)	1.0 μ l	1.0 μ l	MB
Super <i>Tag</i> DNA Polymerase(5 U/ μ l)	0.5 μ l	2.5 U/ μ l	PROTECH
Template DNA	1.0 μ l	30 ng/ μ l	-
distilled water	-	-	-
Total H ₂ O	25 μ l		

Table 3.6 The reaction mixtures of nested PCR.

Components	Volume	Final Concentration	Source
10X PCR buffer	2.5 μ l	1X (contain 1.5 mM Mg ²⁺)	PROTECH
dNTP mix (10 mM of each)	0.5 μ l	200 μ M of each dNTP	PROTECH
341fGC (10 pmole / μ l)	1.0 μ l	0.4 μ M	MWG-Biotech
926R (10 pmole / μ l)	1.0 μ l	0.4 μ M	MWG-Biotech
A934F (10 pmole / μ l)	1.0 μ l	0.4 μ M	MB
U1931RGC (10 pmole / μ l)	1.0 μ l	0.4 μ M	MB
Super <i>Tag</i> DNA Polymerase(5 U/ μ l)	0.5 μ l	2.5 U/ μ l	PROTECH
Template DNA	1.0 μ l	30 ng/ μ l	-
distilled water	-	-	-
Total H ₂ O	25 μ l		

將模板 DNA 雙股完全打開，接著進行 30 個循環：94°C/30 秒，引子黏合溫度/30-45 秒，72°C/30-45 秒，接著最後聚合溫度 72°C/2 分鐘。

3.4.5 變性梯度凝膠電泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis,

DGGE)分析菌群結構

變性梯度凝膠電泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)是利用微生物的 16S rDNA 序列在含有鹼性梯度的 polyacrylamide gel 中泳動特性的不同而將它們分離，每一個經 nested PCR 後的微生物 16S rDNA 序列，在變性梯度膠中泳動後，會形成特殊的菌群結構分佈的影像，藉此可比較在不同培養天數中，混合菌群間的變化。本研究所使用的變性梯度凝膠電泳設備為 DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, USA)，所使用的凝膠百分比因 nested PCR 產物大小而定，0.3-1.0 K 使用 6%凝膠，0.2-0.4 K 使用 8%凝膠及 0.1-0.3 K 使用 10%凝膠進行變性電泳。使用試劑如 Table 3.7 所示。膠片配製完成後，置入電泳槽中，將 nested PCR 產物與 6X loading buffer (5:1)混合後取 20 μ l 注入 well 中，以 55 V 的電壓和 60°C 條件下，進行泳動。電泳完成後，以 5 μ g/ml 之 EtBr 染色 15 分鐘並浸泡於去離

Table 3.7 Reagent and concentration of DGGE. Concentration range of denaturant, 20-60% and 20-70%.

Reagent	Amount		
	20%	60%	70%
Denaturing Solution (6% Gel)			
	20%	60%	70%
Urea	1.68 g	5.04 g	5.88 g
40% Acrylamide/Bis	3 ml	3 ml	3 ml
50X TAE Buffer	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml
Formamide	1.6 ml	4.8 ml	5.6 ml
dH ₂ O	To 20 ml	To 20 ml	To 20 ml
10% APS	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl

子水中退染 10 分鐘，以 254 nm 紫外燈觀察 DNA band 分佈，並使用照相系統存取結果。

3.4.6 變性梯度凝膠膠片萃取

在變性梯度凝膠膠片上所顯現的每一個亮帶即代表不同的操作分類單元(Operational Taxonomic Unit, OTU)，故可藉由膠片回收的方式，將膠片中的核酸片段萃取出來，經由定序可得到每一 OTU 代表之核酸序列。本研究是使用 QIAGEN gel extraction kit 進行膠片中 16S rDNA 序列回收。

選取膠片上形狀完整的單一亮帶，以滅菌手術刀切割下來，置入 1.5 ml 離心管，用滅菌的玻璃棒將切割下膠片破碎後，加入 500 μ l diffusion buffer (含有 0.5 M ammonium acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM EDTA, 1% SDS)，置入 50°C 水浴 30 分鐘，離心(10,000 rpm, 1 分鐘)，以 1 ml 注射針筒取出上澄液，加入針筒型過濾器中以濾紙(Whatman, GF/C; 1 μ m)過濾。加入 1ml buffer QXI 至濾液後需呈現黃色，若加入呈橘色或紫色表示不在最佳操作範圍 pH 7.0-7.5，使用 3 M sodium acetate (pH 5.0) 將溶液調整至呈黃色，加入 10 μ l QIAEX II，搖晃 30 秒後，靜置 10 分鐘(每間隔 2 分鐘進行搖晃一次)，離心(9,000 rpm, 2 分鐘)後去除上澄液，以 PE buffer 沖洗沉澱物，再離心(9,000 rpm, 1 分

鐘)去除上澄液。以風乾方式(10-15 分鐘),待沉澱物變為白色(不宜過乾,會影響 DNA 再溶出效率),加入 20 μ l 去離子水,離心(9,000 rpm, 2 分鐘)後,上澄液即為萃取出之 DNA (每次加入 10 μ l, 可提高 DNA 的溶出效率)。

回收後之產物需再以 nested PCR 的引子進行擴增一次,以提高回收之 DNA 濃度。再擴增回收 DNA 片段所用之 nested PCR 引子需不含 GC-Clamp, 否則會造成定序之結果錯誤。

3.4.7 核酸序列分析

變性梯度膠片中回收後再擴增之 DNA 經 Agarose 電泳檢視產物片段大小無誤後,將這些 PCR 產物送交明欣生物科技有限公司進行定序。定序後所得之序列,以 BioEdit 軟體進行 forward 端和 reverse 端接合,得到完整之序列後,上傳至 NCBI database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)進行 nBLAST 比對,可得相似之菌株,以 BioEdit 匯整成*.fas 的檔案格式,改使用 Mega 3.1 軟體內建的 Clustal W 進行序列間的 alignment,再存成 Mega 3.1 可進行親緣分析之檔案格式(*.meg),繪製成親緣樹 (Phylogenetic tree)。

3.5 嗜熱性甲烷菌之純菌分離

在先前菌群結構分析中，在 Archaea 族群中有明確發現存在有嗜熱性甲烷菌，而以目前文獻中所成功分離出之嗜熱性甲烷菌種類較少，因此在此嘗試是否可在嗜熱纖維降解產甲烷系統中成功分離出甲烷菌，並探討嗜熱性甲烷菌之生長參數。

嗜熱性甲烷菌分離前，須先進行一次的增富培養(enrichment culture)，所使用的培養基為 TA medium，由於甲烷菌族群僅能利用一些短鏈的有機酸為基質，因此將碳源更改為甲酸(100 mM)、乙酸(50 mM)和甲醇(50 mM)後，置入 70°C 培養箱進行培養，並每天監測甲烷產生量，當測得較高之甲烷量時，即取出 0.5 ml 的菌液進行滾管(roll tube)分離菌株(Hungate *et al.*, 1969.)。

將配製好的 2% agar-TA medium 在通入混合氣($N_2/CO_2 = 80\% / 20\%$)下分別分裝 5 ml 至每一 Hungate tube 中，以 n-butyl 橡膠塞及 aluminum seal 封口，以 121°C、1.5 倍大氣壓下滅菌 15 分鐘。滅菌完成後，將裝有熔融之 TA medium 放到 55°C 的水浴槽中，等溫度降至 55°C，加入 0.5 ml 之 Na_2S (100X)、0.5 ml 之 yeast extract (100X)、0.5 ml 之 peptone (100X)和 0.5 ml 之維他命溶液 (100X)，最終濃度為 0.25 g/L Na_2S 、1 g/L yeast extract、1 g/L peptone 和 1X 維他命溶液和最終濃度為 100 mM 之甲酸、50 mM

之乙酸和 50 mM 之甲醇。取 0.5 ml 的增富培養菌液進行連續稀釋，稀釋倍數由 10^{-1} - 10^{-12} 次方。將稀釋 tube 置於冷水中快速滾動，使 agar 均勻凝固在管壁上，由於 agar 在高溫下會溶化，因此滾管放到 55°C 的培養箱中培養。

培養約一星期後，使用解剖顯微鏡觀察並選取單一菌落，再次轉殖到 TA medium 進行培養，再重覆滾管步驟。此分離步驟重覆至少三次，直在顯微鏡下觀察為單一菌相。但本研究在進行分菌時，發現所分離的菌株中含有二種菌相，一為桿菌一為孢頭桿菌，當中以桿菌為主要的優勢族群，而使用萬古黴素進行篩選，也無法成功純化，因此將菌株改培養至 MM medium 中，並以 H_2/CO_2 作為生長基質，再以此方式重覆轉殖五次後，以顯微鏡觀察，發現孢頭桿菌已被篩除，菌相呈單純均一之不規則彎曲桿菌。之後進行後續生長參數探討。

3.5.1 無機鹽培養基

無機鹽培養基(mineral medium, MM medium)(Lai *et al.*, 2002) 為在厭氧操作下進行配製，其成份如 Table 3.8。並加入微量元素，操作步驟與第 3.3.1 節程序相同，其相異之處為在添加 0.5 g/L 之 L-cysteine 及 3.5 g/L 之 $NaHCO_3$ 時一同加入 10 ml/L 維他命溶液。該培養基為培養嗜熱甲烷菌所使用。

Table 3.8 Components of MM medium.

Component	Content	Source
Carbon source		
H ₂ /CO ₂	4:1	
Trace element solution ¹	10.0 ml	
K ₂ HPO ₄	0.40 g	Riedel-deHaën
Resazurin	0.0005 g	Sigma
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.05 g	Riedel-deHaën
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.10 g	Riedel-deHaën
(NH ₄)Cl	1.00 g	Riedel-deHaën
L-Cysteine	0.50 g	Sigma
NaHCO ₃	3.50 g	Riedel-deHaën
Vitamin solution ²	10 ml	
*Na ₂ S · 9H ₂ O	0.25 g	Riedel-deHaën
Dist. H ₂ O	add to 1000 ml	

¹ : 微量元素成分如 Table 3.9

² : 維他命溶液成分如 Table 3.10

* : 殖菌前加入

Table 3.9 Components of trace element solution of MM medium.

Component	Content	Source
conc. HCl [*]	1.0 ml	Riedel-deHaën
NiCl ₂	0.02 g	Riedel-deHaën
EDTA ^{**}	0.50 g	Riedel-deHaën
H ₃ BO ₃	0.01 g	Riedel-deHaën
FeCl ₂ · 4H ₂ O	0.1 g	Riedel-deHaën
CuCl ₂	0.02 g	Riedel-deHaën
ZnCl ₂	0.1 g	Riedel-deHaën
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.01 g	Riedel-deHaën
MnCl ₂	0.1 g	Riedel-deHaën
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.15 g	Riedel-deHaën
AlCl ₃	0.05 g	Riedel-deHaën
Na ₂ SeO ₃ · 5H ₂ O	0.03 g	Riedel-deHaën
Na ₂ WO ₄	0.03 g	Riedel-deHaën
Dist. H ₂ O	add to 1000 ml	

*: add HCl to some water first.

**: EDTA should be added after all other components.

Table 3.10 Components of vitamin solution of MM medium.

Component	Content	Source
Biotin	2.0 mg	Sigma
Thiamine-HCl	5.0 mg	Sigma
Pyridoxine-HCl	10.0 mg	Sigma
Nicotinic acid	5.0 mg	Sigma
Riboflavin	5.0 mg	Sigma
Vitamin B ₁₂	0.1 mg	Sigma
DL-Ca-pantothenate	5.0 mg	Sigma
Lipoic acid	5.0 mg	Sigma
P-aminobenzoic acid	5.0 mg	Sigma
Folic acid	2.0 mg	Sigma
Thioctic acid	5.0 mg	Sigma
Dist. H ₂ O	add to 1000 ml	

3.5.2 嗜熱甲烷菌之 16S rDNA 分析

3.5.2.1 甲烷菌之 DNA 萃取

取 50 ml 菌液置入微量離心管中，以 13,000 rpm 離心 10 分鐘後去上層液，加入 500 μ l solution I (含有 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0))，於 37°C 反應 30 分鐘，其目的為破壞細胞壁。加入 10 μ l 的 proteinase K (10 mg/ml) 和 25 μ l 的 20% SDS，於 37°C 反應 30 分鐘，其目的為在使蛋白質變性。進行三次冷凍(-70°C，冷凍 10 分鐘)/解凍(70°C，解凍 10 分鐘)循環，使細胞壁破壞更完全。加入 10 μ l 的 RNase (10 mg/ml) 於 37°C 反應 30 分鐘，其目的為去除 RNA，反應完後，以 13,000 rpm 離心 10 分鐘後取上層液，加入等量之 phenol/chloroform-Isoamyl alcohol 溶液(25:24:1)，與萃取液混合後 13,000 rpm 離心 10 分鐘後取上層液，加入等量之 chloroform-Isoamyl alcohol 溶液(24:1)，與萃取液混合後 13,000 rpm 離心 10 分鐘後取上層液，目的為去除殘餘的 phenol。加入 1/5 倍 7.5 M 的 ammonium acetate 和 2.5 倍 100% 的乙醇，放入 -70°C 冷凍 1 小時後，以 13,000 rpm 離心 10 分鐘後去上層液，加入 1 ml 的 70% 乙醇，以 13,000 rpm 離心 10 分鐘後去上層液，其目的為去除殘餘的鹽類。自然風乾後，加入 50 μ l 的 70°C 無菌水溶解

DNA。

3.5.2.2 嗜熱甲烷菌之 16S rDNA 擴增與親緣分析

嗜熱性甲烷菌株之 16S rDNA 的鑑定選用之引子是以針對甲烷菌為主，可提高 PCR 產物之專一性和準確性。故本實驗所選定 coccus 1: 5'- CGA CTA AGC CAT GCG AGT C-3' 與 reverse 3: 5'- GTG ACG GGC GGT GTG TGC AAG-3'，之後擴增之 PCR 產物再送交明欣生物科技有限公司進行定序，定序後所得之序列，以 BioEdit 軟體進行 forward 端和 reverse 端接合，得到完整之序列後，再根據 3.4.7 節之親緣分析方法進行分析。

3.6 革蘭氏染色

微生物的鑑別染色是利用一種以上的染劑進行染色，其主要目的有二，一為使用在微生物的分類，一為可有利觀察細胞壁構造的觀察，本研究是選用革蘭氏染色法作為初步的判別。由於甲烷菌的細胞壁結構與一般菌種的結構不同，因此使用此方法並無法正確的辨別是否為革蘭氏陽性菌或革蘭氏陰性菌。故染色實驗主要目的是為了方便細胞的觀察以及觀察是否有其他的菌株存在。革蘭氏染色法操作步驟如 Table 3.11。

Table 3.11 Procedures and results of each step of gram stain.

使用試劑	反應及染色結果		染色時間
	革蘭氏陽性(G+)	革蘭氏陰性(G-)	
結晶紫(Crystal Violet)	細胞染成紫色	細胞染成紫色	60 sec
碘液(Gram Iodine)	形成 CV-I 複合物	形成 CV-I 複合物	60 sec
乙醇(95% EtOH)	細胞壁脫水，發生多孔性收縮，降低 CV-I 滲出細胞，細胞呈現紫色。	脂質從細胞壁被抽出，多孔性增加，CV-I 滲出細胞，造成脫色。	30 sec
沙黃(Safranin)	細胞仍呈現紫色	細胞呈現紅色	45 sec

3.7 菌株形態觀察

3.7.1 位相差顯微鏡(Phase contract microscope)

利用位相差顯微鏡(Olympus BX40, Japan)對菌株作初步的外觀、菌相、特徵、移動性和染色觀察。

3.7.2 穿透式電子顯微鏡(Transmission electron microscope, TEM)

穿透式電子顯微鏡(JEOL JEM-200CX)觀察是利用中興大學貴重儀器中心，目的為觀察甲烷菌的細胞壁以及是否具有鞭毛等特徵。而在進行穿透式電子顯微鏡觀察時，樣品須先進行固定和負染色以利觀察。

取 1 ml 的 log-phase 培養菌液置入無菌微量離心管中，以 13,000 rpm 離心 10 分鐘，去上層液，加入 100 μ l MM mediun vortex 5 秒，使菌體重新懸浮，取一滴 0.1% bacitracin，再將銅網置放其上 30 sec，之後以濾紙小心吸乾多餘的 0.1% bacitracin，取一滴菌液滴於銅網上，靜置 10 分鐘，之後再以濾紙小心吸乾多餘的菌液，滴上 1%或 2%的 Uranyl acetate 進行負染色，靜置 5-10 秒，以濾紙吸除多餘的染劑。

經上述處理後之銅網即可在穿透式電子顯微鏡下進行菌相觀察及照像。

3.7.3 菌種保存

先將 120 ml 血清瓶充填氮氣，使瓶內為無氧狀態後，加入 30 ml 的甘油，封瓶放入滅菌釜中滅菌 15 分鐘後取出，再以氮氣進行氣體置換，目的為利用滅菌後之高溫，使甘油的氧氣散發至血清瓶之瓶頂空間後以氮氣進行氣體置換，使甘油能保持在厭氧狀態，隨後放入厭氧操作箱中存放。保存菌株時取 0.2 ml 的甘油，分裝至 4 ml 之滅菌玻璃瓶中，再加入 2 ml 菌液(中對數期，OD₆₀₀: 0.08-0.09)，混合均勻後置於-70°C 冰箱保存。

3.8 基質利用測試

本研究配製數種不同基質濃度為 1 M 之儲備溶液(stock solution)，使用時直接加入 MM medium 中稀釋成使用濃度後 (Table 3.12)，放入 70°C 培養箱中培養，氮氣充填是先接上調壓閥後，調整壓力為 0.6 kg/cm² 後，以無菌針頭插入內含 20% CO₂ 之 Hungate tube 中充填 10 秒。此實驗分為兩組，一組為原本的 MM medium 而另一組則是在 MM medium 中添加入 yeast extract (1 g/L)，主要目的為測試 yeast extract 有無添加是否會影響菌株對基質的利用。此外部份甲烷菌在最佳利用基質條件下，再額外添加入其他的基質 (Table 3.13) 以共利用方式培養 (co-utilized) 可促

Table 3.12 Substrates used for utilization test.

Component	Final Concentration (mM)	Source
Sodium formate	100	J. T. Baker
Sodium acetate anhydrate	50	J. T. Baker
Methanol (100%)	50	Merck
2-propanol (99.8%)	47.6	Flucka
Iso-butanol (99.9%)	47.6	J. T. Baker
Trimethylamine	40	J. T. Baker
Sodium pyruvate	50	Sigma
Hydrogen *	-	

*:以 0.6 kg/cm² 充氣 10 sec

Table 3.13 Co-utilized substrates used for growth of the isolated methanogen.

Substrate add^a	Atmosphere	Source
None [*]	H ₂ /CO ₂ (80%/20%)	
Sodium formate	H ₂ /CO ₂ (80%/20%)	J. T. Baker
Sodium acetate anhydrate	H ₂ /CO ₂ (80%/20%)	J. T. Baker
Sodium pyruvate	H ₂ /CO ₂ (80%/20%)	Sigma
Sodium formate	N ₂ /CO ₂ (80%/20%)	J. T. Baker
Sodium acetate anhydrate	N ₂ /CO ₂ (80%/20%)	J. T. Baker
Sodium pyruvate	N ₂ /CO ₂ (80%/20%)	Sigma

^a:加入基質濃度：Sodium formate, 100 mM; Sodium acetate anhydrate, 50 mM; Sodium pyruvate, 50 mM ^{*}:以 0.6 kg/cm² 充氣 10 sec.

進菌株的生長，目的為測試是否可促進菌株之生長及提高甲烷產量。

3.9 生長因子測試

Yeast extract 和 peptone 兩種物質皆為高營養之有機物質，這兩種營養物質在培養基中往往扮演提供胺基酸和蛋白質給微生物使用，故本實驗目的為測試實驗室中所分離出的嗜熱性甲烷菌對 Yeast extract 和 peptone 的需求性。以及添加其他基質是否會刺激菌株之生長。MM 培養基分別添加 1 g/L 之 yeast extrace 或 1 g/L 之 peptone 為測試濃度。同為觀察培養基中同時有 yeast extrace 及 peptone 存在時對生長之影響，另一組皆不添加做為對照組，觀察分離菌株之生長和甲烷生成量之差異。

3.10 溫度

溫度對微生物的生長是很重要的影響因子之一，在適當的溫度條件下可促進甲烷菌株之生長及甲烷生成量，因此本實驗將溫度分別設定為 45、50、55、60、65、70 及 75°C 同時進行培養。

3.11 pH 值

本研究測定菌株之最佳 pH 值，是以 54 g/L 碳酸氫鈉調整培

養基之 pH 值，分別為 pH 5、5.5、6、6.5、7、7.5 和 8.0，當 pH 值調整 7.5 和 8.0 時是直接稱取碳酸氫鈉粉末直接加入，而瓶頂空間是填充 N₂/CO₂ (80%/20%)，調整好後封瓶，以高溫高壓滅菌釜進行滅菌（121°C、1.5 倍大氣壓，滅菌 15 分鐘）。

3.12 氯化鈉濃度

由於部份的甲烷菌具有耐鹽的能力，故進行不同氯化鈉濃度之測試，先前不同生長因子測試，發現添加 yeast extract 時可有效刺激菌株之生長，故本實驗設計兩組條件，一組為不添加 yeast extract，另一組為添加 1 g/L 之 yeast extract，而氯化鈉測試濃度為 0.26 M (1.5%)、0.52 M (3%)、0.65 M (3.8%)、1 M (5.8%)。

3.13 抗生素感受測試

抗生素可有效殺死或抑制微生物的生長，但因作用的方式不同，所以並非單種抗生素可對全部微生物皆有作用，而不同的微生物對抗生素的感受性也不同，有些對多種抗生素有高感受性，有些則僅對單一種抗生素有高感受性。本研究選用六種抗生素 (Table 3.14)，進行分離菌株對抗生素之抗性研究。

Table 3.14 Characteristics of antibiotics tested in this study and their modes of action (Boyd and Hoerl, 1991).

Antibiotic[*]	Inhibition mechanism	Final Concentration
Rifampicin	Nucleic acid synthesis	100 µg/ml
Ampicillin	Cell wall synthesis	2 mg/ml
Vancomycin	Cell wall synthesis	100 µg/ml
Polymyxin B	Cytoplasmic membrane	100 µg/ml
Choramphenical	Protein Synthesis	100 µg/ml
Tetracycline	Protein Synthesis	100 µg/ml

* : antibiotics source: Rifampicin, USB; Ampicillin: Melfoed Laboratories Ltd.; Vancomycin: Sigma; Polymyxin B: Sigma; Choramphenical: Boehringer Mannheim GmbH; Tetracycline: Sigma

3.14 SDS 感受性測試

Sodium dodecyl sulfate (SDS)為一種介面活性劑，可使蛋白質變性之物質。由於某些甲烷菌之細胞壁為一層堅韌表面蛋白質，使其對抗極端環境，但並非所有之甲烷菌對 SDS 都具有高度之感受性，本實驗利用 SDS 溶解蛋白質性細胞壁使細胞因無法抵抗滲透壓而溶解。使用 $OD_{600\text{ nm}}$ 偵測添加 SDS 及無添加 SDS 之菌液吸光值變化，並以 *Escherichia coli* 及 *M. thermautotrophicus* 為對照組與菌株 THUT3 進行感受性比較。SDS 感受性標準操作步聚如下所述(Boone *et al.*, 1988)：取 700 μl 之對數生長期至對數生長末期之菌液，加入 SDS 溶液使其最終濃度為 0.01 % (w/v)，混合均勻；一組未添加 SDS 作為對照組。兩組皆反應 10 分鐘後以顯微鏡觀察及量測 $OD_{600\text{ nm}}$ 的變化。使用標準方法所使用的 SDS 濃度發現對 *Escherichia coli*、*M. thermautotrophicus* 及菌株 THUT3 並無明顯效果，故增加 SDS 濃度至 0.2、0.5 及 2%加以比較。

3.15 G+C content (guanine plus cytosine content)分析

該實驗目的為測定分離菌株之 genomic DNA 中 G+C 所佔之含量，成為菌種分類上依據，分析需要純度較高之 genomic DNA，故 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 比值需介於 1.5-2.0，DNA 萃取方法參照

3.5.2.1 節。G+C content 之操作如下所述 (Boone and Whitman, 1988)：取 25 μl DNA 樣品(0.08-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)置於 1.5 ml 離心管中，將樣品加熱至 100°C 反應 2 分鐘後，置於冰浴中，加入 50 μl 之 30 mM sodium acetate buffer (pH 5.3)、5 μl 之 20 mM ZnSO₄ 及 3 μl 之 P1 nuclease (1 mg/ml in sodium acetate buffer, 340 U/ml) ，置於 37°C 反應 2 小時，再加入 10 μl 1X CIP buffer 以及 0.1 μl alkaline phosphatase 於 37°C 反應 1 小時，再加入 2.5 μl 200 mM 之 EDTA、4.4 μl 無菌水以及 100 μl 之 100% alcohol，輕微晃動後，以 14,000 xg 轉速離心 5 分鐘後，到掉上清液並用 100 μl 無菌水(預熱)回溶。反應完畢之樣品若不分析則可置於-20°C 保存。

將處理好的樣品利用高效率液相層析儀進行 genomic DNA G+C 含量分析。使用的層析管柱為 C₁₈ reverse-phase column，移動相溶液為 20 mM triethylamine phosphate with 12 % methanol (pH 5.1)，將流速控制在 1.0 ml/min，UV 偵測波長為 254 nm，分析時間約 18 分鐘，每次注入樣品 50 μl 。與標準圖譜對照並以各種不同含氮鹽基的積分值計算出各菌株的 genomic DNA G+C 含量。

3.16 分析方法

3.16.1 生長速率

測量菌株生長的有很多種方式，包含在顯微鏡下直接計數、量秤菌體乾重、測量蛋白質和菌液濁度之改變，本研究採用測量菌液濁度改變之方試，以分光光度計(spectrophotometer, Spectronic 20D+)在 600 nm 波長下量測菌液之吸光值。

3.16.2 甲烷濃度分析

甲烷濃度以 GC-FID 量測，使用毛細管柱型號為 DB-WAX (30 m×0.319 mm×0.5 μm)，以高純氮為載流氣體，oven temperature 設為 40°C，injector temperature 為 200°C，detector temperature 為 250°C，以此設定條件進行分析。分析如下所述：配製不同的甲烷濃度 (10、20 及 30 μmole) 製作檢量曲線，取 100 μl 注入氣相層析儀，看測得的值是否超過全部設定濃度的線性範圍，如果因濃度過高導致曲線變平，則必需濃度縮小範圍使靈敏度降低。利用注入的 100 μl 之 30 μmole 甲烷積分面積 (peak area)，以三重複的方式分析。計算甲烷莫耳濃度：甲烷莫耳濃度 (moles CH₄)=[Pressure (atm)×樣品體積 100 μl]/0.082×溫度(°K)。校正因子：Calibration factor (CF)=(moles CH₄/100 μl)/peak area。利用注射針取樣時，先將氣密閥關閉，小心將針頭穿過塞子，插入瓶中

後，打開氣密閥，取 100 μl 的瓶頂氣體 (headspace gas)，將氣密閥關閉後，小心取出針頭，將樣品注入氣相層析儀，將出現的積分面積以下面的式子計算，甲烷濃度 (M)： $\text{moles CH}_4 (100 \mu\text{l}) = \text{peak area} \times \text{CF 值}$ 。瓶頂空間之總甲烷濃度 (moles)： $[\text{瓶頂體積 (liters)} / 100 \mu\text{l}] \times \text{moles CH}_4 (100 \mu\text{l})$ 。