

第四章 結果與討論

4.1 纖維分解產甲烷混合菌群樣品來源

本研究分析菌群結構之樣品，為本實驗室以 α 纖維素為碳源，置於 70°C 下培養之混合菌群。培養基中的 α 纖維素在八天內可達到完全降解，每兩天取 10 ml 的菌液離心，採樣的天數分別 2、4、6 和 8 天的樣品進行 DNA 萃取後，經 PCR-nested PCR 擴增其中 16S rDNA 部份片段，再由 DGGE 分離這些片段作為菌群分析之依據。

4.2 核酸萃取所得 DNA 濃度及純度

本研究萃取核酸方法係修改自 1997 年 Liu 氏所提出的方式 (Liu *et al.*, 1997)，該方法是先利用 Lysozyme 與 SDS 以化學作用破壞細胞壁，再用冷熱間歇的物理方式加強對細胞壁的破壞。實驗數據結果如 Table 4.1 所示，在 DNA 濃度上，可看出濃度會隨著培養時間的增加而有所變化，從採樣的第二天至第四天可看出所得的 DNA 含量有明顯的增加，但在第四天之後所測得的濃度就開始降低，可能的原因為菌群的生長會隨著時間增加，但在第四天後，菌群進入內呼吸期，菌群開始死亡減少；另一原因為菌群在第四天之後，有其他的菌群轉變成為主要的優勢菌種，而

Table 4.1 The DNA concentration and purity extracted from the mixed culture in different incubation time.

Samples	DNA concentration^a (ng/ul)	DNA/protein(A_{260}/A_{280})
Day 2	425	1.5
Day 4	671	1.9
Day 6	374	1.4
Day 8	297	1.6

^a: $A_{260} \times \text{dilute multiple} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$

本研究所使用的萃取方法，對該菌群的萃取效果並不理想所造成。

以 DNA 純度探討發現，使用此種萃取方法，所得之 DNA 之純度都介於 1.4-1.9 之間，而理論最佳之純度是從 1.8-2.0 或以上的值，但本研究部份樣品其純度雖低於 1.8，但是經後續實驗發現並不會造成分析上的干擾，故未予純化。

4.3 PCR 擴增 16S rDNA 片段

進行 PCR 反應時，需要一組引子(primer)，也就是寡核苷酸(oligonucleotide)，作為 DNA 擴增的起點及終點，PCR 產物之大小是取決於兩個引子所界定的範圍。而針對預擴增之基因特性，會使用不同的引子，因此引子必須具有專一性才可得正確之 PCR 產物。本研究為了分析嗜熱纖維降解產甲烷之菌群結構，而選用了針對擴增 Bacteria 和 Archaea 兩大族群的引子，主要原因為纖維降解菌群在分類上是屬於 Bacteria，因此選用 27F/1522R，而該組引子主要是針對 Bacteria domain。在此一系統其最終產物為甲烷，就目前文獻僅在 Archaea domain 中的甲烷菌群才具有產甲烷之能力，但為分析整個系統中完整的菌群結構，故選用 A23F/A1391R 此組 Archara-specific 引子來分析 Archaea。

在整個 PCR 過程中模版 DNA 濃度及 annealing 溫度會影響 PCR 反應之成功與否，當模版 DNA 濃度過高時，在進行 PCR 反應會產生 DNA 競爭現象，易有非預期產物出現，甚至會造成完全無產物的現象，故本研究在進行 16S rDNA 擴增，將模版 DNA 濃度稀釋至 30 ng/μl。另一個重要參數為 annealing 溫度，即為引子與目標 DNA 黏合溫度，一般初始測試溫度以引子的 T_m 值減 5°C，之後檢視 PCR 產物之結果來進行溫度的調整，假若結果除了預期 DNA 大小之片段產物之外，還有非預期片段產物出現，則需調高 annealing 溫度，提高引子的專一性，每次溫度調整以不超過二度為限。若產物的濃度少或者無產物，則需降低 annealing 溫度，降低引子的專一性，提高引子與模版 DNA 的黏合。以上參數調整如果皆無法有效解決，可考慮調整 Taq 聚合酵素、鎂離子和 dNTP 等反應藥劑濃度。本研究最後測試出的最佳 annealing 溫度；Bacteria 為 59°C、Archaea 為 58°C，反應條件如 Table 4.2 所示，進行 30 次循環複製，其產物大小分別為 1500 及 1400 bp (Fig. 4.1)。

Table 4.2 Conditions for PCR amplification of 16S rDNA from cellulose-degrading mixed culture.

Sample	Activation temp.	Denaturation temp.	Annealing temp.	Extension temp.	Final extension temp.
Bacteria	94°C, 5 min	94°C, 45 sec	59°C, 45 sec	72°C, 45 sec	72°C, 2 min
Archaea	94°C, 5 min	94°C, 30 sec	58°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 2 min

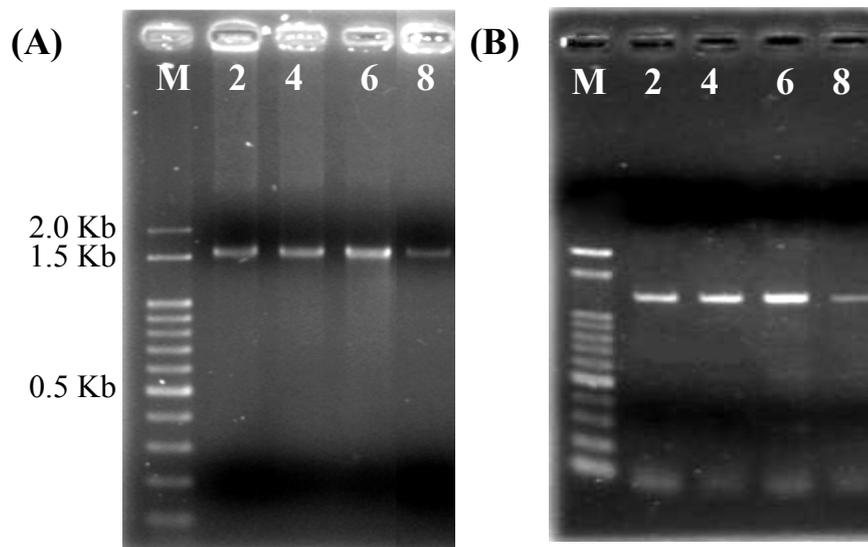


Fig. 4.1. Electrophoresis of PCR-amplified bacterial 16S rDNA from cellulose-degrading thermophilic mixed culture. (A) PCR-amplified 16S rDNA of Bacteria domain. (B) PCR-amplified 16S rDNA of Archaea domain. M: DNA molecular weight marker, 0.1 k-2.0 Kb.

4.4 DGGE 進行纖維分解產甲烷混合菌群結構分析

4.4.1 Nested PCR

DGGE 電泳對分離核酸片段之長度大小有限制，因此 4.3 節之 16S rDNA 產物作為 Nested PCR 反應中的模版 DNA。由於在 16S rDNA 中含有變異性的區段(variable regions)，不同種微生物該區段之序列差異性較大，故可提供較多區別而有利於分類。本研究所選用之 nested PCR 引子 Eubacteria 為 341fGC/926R；Archaea 為 A934F/U1391RGC。本研究最後試出的最佳 annealing 溫度 Bacteria 為 57°C、Archaea 為 54°C，反應條件如 Table 4.3 所示，進行 30 次循環複製，其產物大小分別為 Bacteria domain 600 bp, Archaea domain 500 bp (Fig. 4.2)。

Table 4.3 Conditions for amplifying variable regions of 16S rDNA by nested PCR.

Sample	Activation temp.	Denaturation temp.	Annealing temp.	Extension temp.	Final extension temp.
Bacteria	94°C, 5 min	94°C, 45 sec	57°C, 45 sec	72°C, 45 sec	72°C, 2 min
Archaea	94°C, 5 min	94°C, 30 sec	54°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 2 min

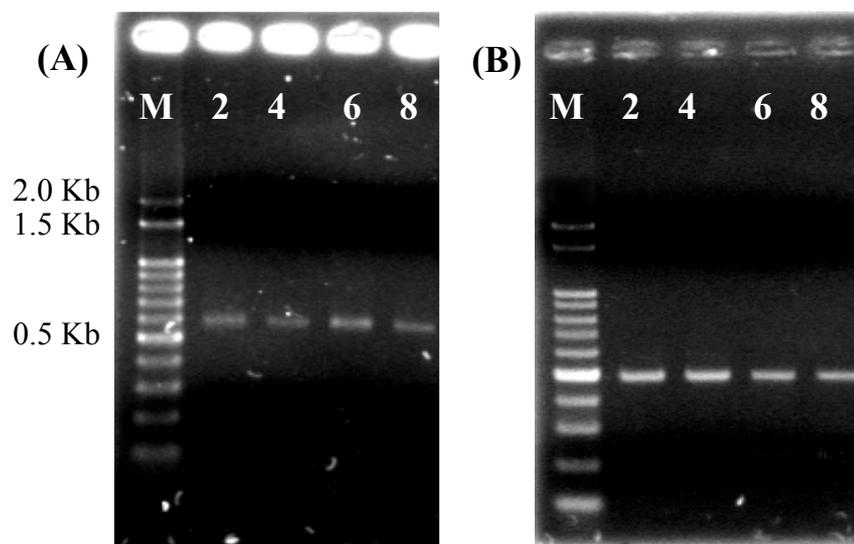


Fig. 4.2 Electrophoresis of nested PCR amplified variable region fragment of 16S rDNA. (A) 16S rDNA variable region of Bacteria domain. (B) 16S rDNA variable region of Archaea domain. M: DNA molecular weight marker, 0.1 k-2.0 Kb.

4.4.2 變性梯度凝膠電泳(DGGE)分析

經 Nested PCR 後之樣品，利用不同變性梯度範圍進行變性電泳分離各 DNA 片段，藉此觀察嗜熱纖維降解產甲烷之菌群在不同培養天數下的變化。Bacteria 分析條件如 Table 4.4，結果如 Fig. 4.3A 所示，從 2、4 天中可看出 Bacteria 菌群並無明顯的變化，僅在編號 Eub 9 在第四天時亮帶有些不集中，當培養至第 6 至 8 天時，編號 Eub 7 的亮帶才在第 6 天出現，由此可見，在嗜熱纖維降解產甲烷之菌群中在 Bacteria 的族群除了 Eub 7 族菌在培養 6 天後出現外，其餘族群並無明顯的變化。Archaea 分析條件如 Table 4.4，結果如 Fig. 4.3B 所示，由 DGGE 的圖譜可明顯觀察到，在 Archaea 菌群的多樣性，遠比 Bacteria 豐富，主要因為，此一樣品的培養溫度是 70°C，而對於中溫造紙廠之 Bacteria 而言，此培養溫度可生長族群已相對減少許多，故所分析的族群多樣性，就較趨於單純，但對 Archaea 此溫度可能才進入該族群的生長範圍之中，因此 Archaea 的多樣性才會比 Bacteria 豐富。而在 Archaea 菌群分析上發現，第 4、6 天的亮帶比第 2 和第 8 天高，在第 2 天編號 Arc 1 在第 4 天之後就消失了，編號 Arc 10 在第 4 天出現過，但在第 6 天也消失，到了第 8 天則是又出現，原因可能是纖維在降解過程中所產生的代謝產物累積(如乙酸)造

Table 4.4 Conditions for denature gradient gel electrophoresis of Bacteria and Archaea.

Running condition	Bacteria	Archaea
Gradients rage	20-60%	20-70%
Gel temperature	60°C	60°C
Voltage	55 V	55 V
Running time	17 hr	16 hr

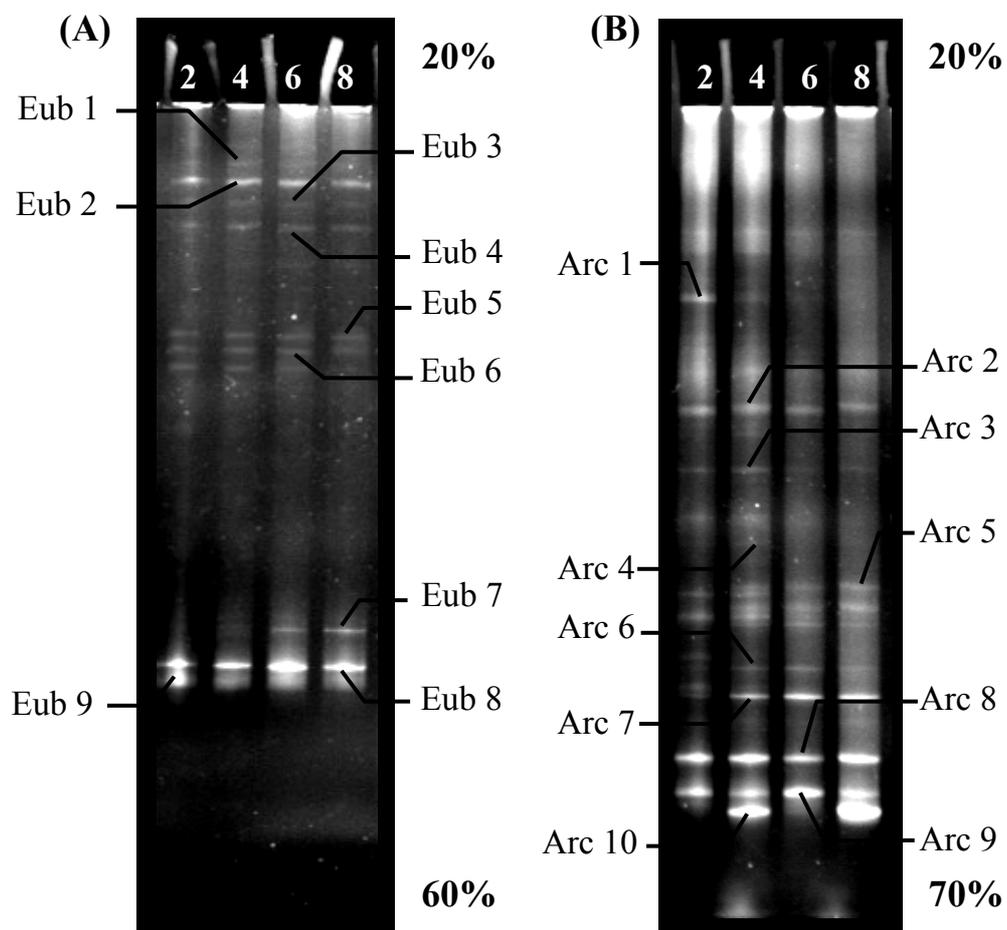


Fig. 4.3 DGGE profiles of the thermophilic cellulose-degrading bacterial community (A) and archaeal community (B). 2-8: incubation days. Eub 1-9: bacterial bands numbers. Arc 1-10: archaeal bands numbers.

成該族群受到抑制而減少，而偵測不到；但到了後了期，該代謝物被其他菌群利用減少後，該族群才又出現。

4.4.3 纖維分解產甲烷混合菌群結構分析

選定固定之變性梯度範圍後，依據 DGGE 膠片上的亮帶，挑選在不同天數皆存在的亮帶以及後期出現的亮帶，小心切下；在本實驗中必須確定所選取的亮帶完整，且要單一亮帶，否則回收核酸序列後，以不含 GC clamp 之引子進行 PCR 擴增後送交定序，會造成定序錯誤。

DGGE 電泳膠片所得之核酸序列可視為一個 OTU (operational taxonomic unit)，由於本實驗所得之 DNA 片段僅 500、600 bp，故在親源鑑定上只能討論所屬之 group。

經切膠回收，再經 PCR 擴增各 DNA 片段，將各片段定序後，Bacteria domain 共得 9 個序列而 archaea domain 共得 10 個序列(附錄 1)。將這序列進行核酸片段之間之相似度比對，該比值為 0-1 之間，數值愈接近 1 表示核酸序列相近；0 則表示完全相異。由 Table 4.5 可看出 bacteria 所得核酸序列互相比對後，其相似度最高為 0.76，最低為 0.01；Table 4.6 則是 archaea 所得核酸序列互相比對後，其相似度最高為 0.79，最低為 0.11，一般相似度在 0.95 以上可視為相似之序列，但在此所得之比值皆低於 0.95，表示本

Table 4.5 The similarity of variable region in 16S rDNA among isolated Bacterial OTU.

	Eub 1	Eub 2	Eub 3	Eub 4	Eub 5	Eub 6	Eub 7	Eub 8	Eub 9
Eub 1	1	0.73	0.63	0.72	0.75	0.72	0.72	0.74	0.75
Eub 2		1	0.75	0.04	0.71	0.05	0.04	0.68	0.75
Eub 3			1	0.75	0.76	0.74	0.74	0.72	0.75
Eub 4				1	0.72	0.02	0.02	0.70	0.75
Eub 5					1	0.71	0.72	0.73	0.72
Eub 6						1	0.01	0.70	0.74
Eub 7							1	0.70	0.75
Eub 8								1	0.72
Eub 9									1

Table 4.6 The similarity of variable region in 16S rDNA among isolated Archaeal OTU.

	Arc 1	Arc 2	Arc 3	Arc 4	Arc 5	Arc 6	Arc 7	Arc 8	Arc 9	Arc 10
Arc 1	1	0.73	0.71	0.73	0.74	0.72	0.75	0.77	0.75	0.73
Arc 2		1	0.39	0.73	0.74	0.73	0.72	0.75	0.76	0.39
Arc 3			1	0.70	0.70	0.71	0.70	0.75	0.77	0.24
Arc 4				1	0.57	0.56	0.58	0.70	0.74	0.73
Arc 5					1	0.11	0.17	0.33	0.77	0.73
Arc 6						1	0.16	0.34	0.77	0.73
Arc 7							1	0.35	0.79	0.75
Arc 8								1	0.72	0.73
Arc 9									1	0.63
Arc 10										1

實驗所有核酸片段無完全相似之序列，經 DGGE 分離之核酸片段均來自不同之 OTU。將所得之定序結果與 NCBI 之 database 比對可得較相似之菌種，再繪製成親源關係圖。而親源關係圖中所設定之統計方法及參數如下：距離矩陣法(distance matrix methods)：鄰近連接分析(neighbor-joining method) (Saitou and Nei, 1987)及 substitution models: Kimura 2-Parameter, Bootstrap Replication: 500。

Bacteria 親源分析結果如 Fig. 4.4 所示，所擷取的單一亮帶有 9 個，9 個 OTU 皆屬 *Anaerocellum* group，該菌屬在分類學上是為 Bacteria domain 中之 *Firmicutes* 門，*Clostridia* 綱，*Clostridiales* 目，*Anaerocellum* group。*Anaerocellum* group 為一群 low G+C，革蘭氏陽性，纖維素分解嗜熱厭氧菌。而本實驗所得之 bacteria 序列經 NCBI database 比對後，選取相似度較高之前五菌株來繪製親源關係圖，發現與所有研究序列(Eub 1~ Eub 9)相似度最高之前三菌株，皆為 *Anaerocellum thermophilum*、*Thermoanaerobacter cellulolyticus* 和 *Caldocellum saccharolyticum*。這三株菌種所生長之溫度範圍分別為 72-75°C、75°C 及 70°C，且均能分解纖維素 (Frederick *et al.*, 1993)。

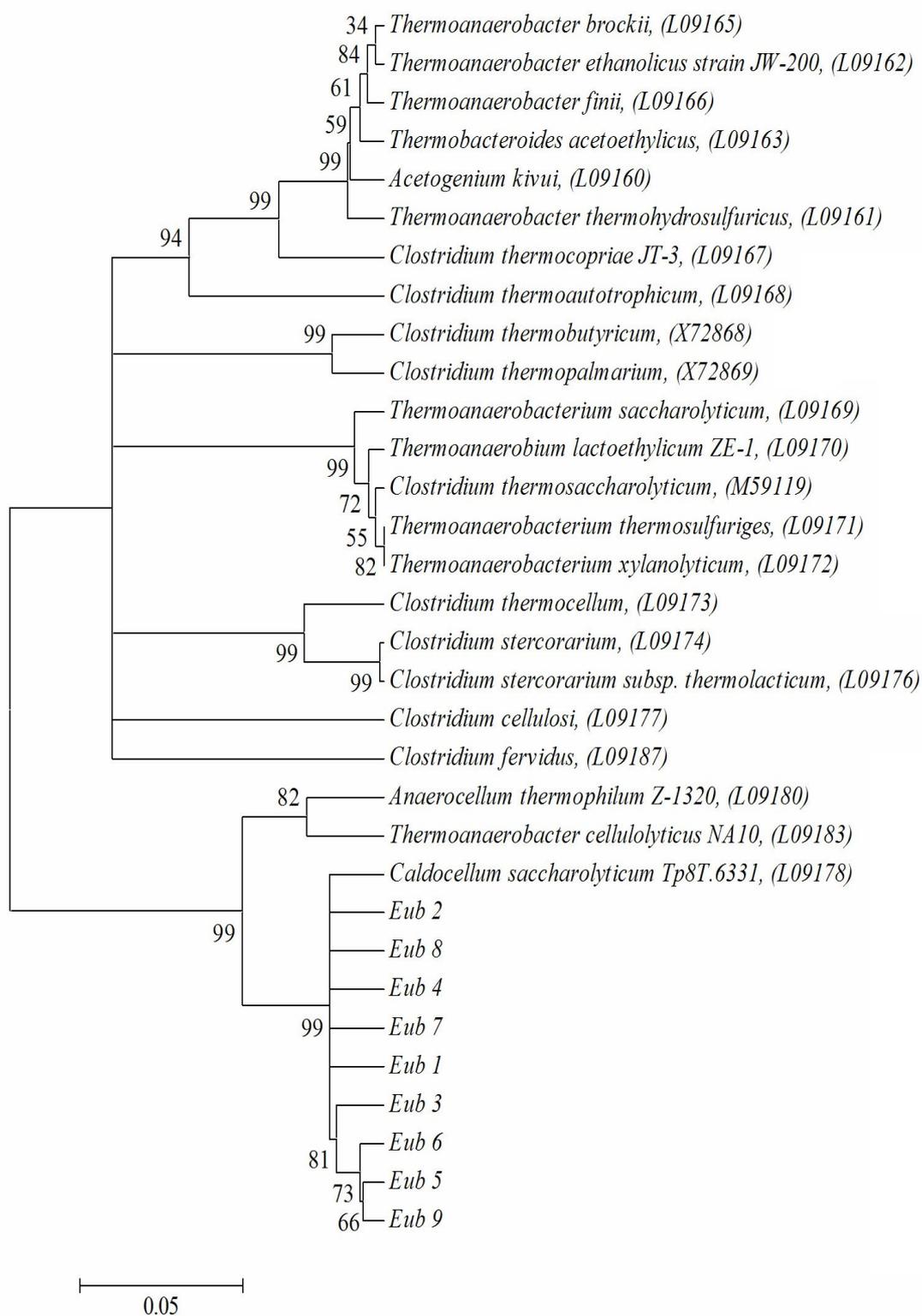
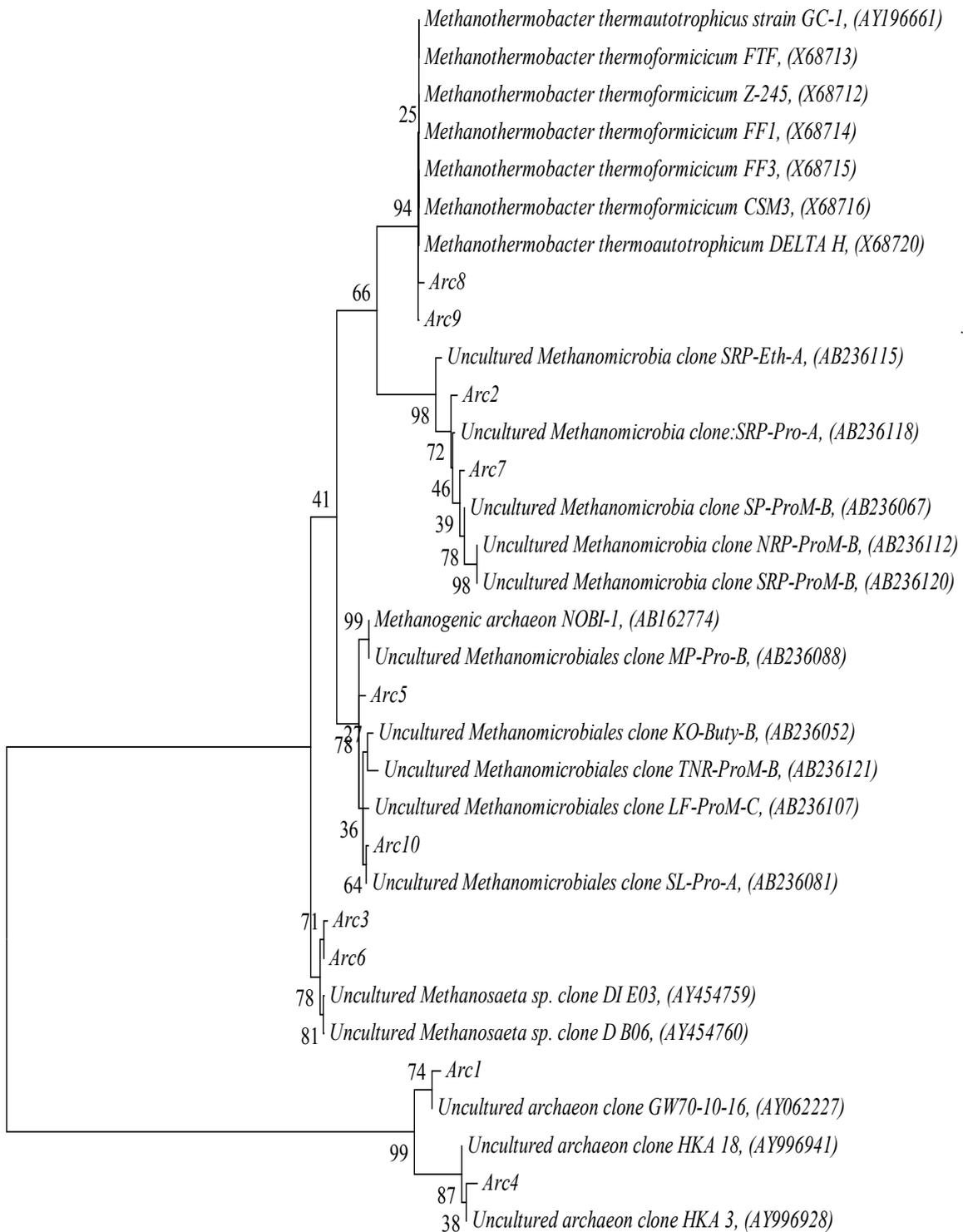


Fig. 4.4 Phylogenetic analysis of eubacteria in the thermophilic, anaerobic, cellulose-degrading consortia. Scale bar indicates 5 substitutions per 100 nucleotides.

Anaerocellum thermophilum 可以纖維素(cellulose)及木糖(xylan)為碳源，在分解纖維素主要的醱酵產物為乙酸，但也會產生少量的乳酸和乙醇，而二氧化碳和氫氣也是最終產物之一(Sylvia *et al.*, 1995)。*Thermoanaerobacter cellulolyticus* 也是可以纖維素及木糖為碳源，而醱酵纖維素後之產物為乙酸及少量乳酸，最主要之代謝氣相產物為二氧化碳和氫氣(Masahito *et al.*, 1988)。*Caldocellum saccharolyticum* 在 1994 年時已被更名為 *Caldocellulosiruptor saccharolyticus* (Vladimir *et al.*, 1998)，同樣該菌株也是可以纖維素及木糖為碳源，醱酵纖維素後之產物為乙醇及乙酸 (Christopher *et al.*, 1987)。而本實驗混合菌株培養之溫度為 70°C，且是以纖維素作為培養碳源。在分析培養過程中瓶頂空間之氣體(headspace gas)後，發現含有大量之甲烷產生。目前已知許多甲烷菌族群，皆可利用乙酸或以氫氣作為電子提供者還原二氧化碳的方式產生甲烷，因此本研究菌群在分解纖維素過程中得到此結果應是合理的。

Archaea 親源分析結果如 Fig. 4.5 所示，所擷取的單一亮帶有 10 個，10 個 OTU 中只有一個 group 明確分類出是屬於 *Methanothermobacter*，其餘樣品比對結果僅能得知是屬於



0.1

Fig. 4.5 Phylogenetic analysis of archaea in the thermophilic, anaerobic, cellulose-degrading consortia. Scale bar indicates 10 substitutions per 100 nucleotides.

uncultured archaeon、uncultured *Methanomicrobia* clone 序列和 uncultured *Methanosaeta* 環境樣品。而本實驗所得之 archaea 序列經 NCBI database 比對後，選取相似度較高之前五菌株來繪製親源關係圖。

Methanothermobacter 在分類學上是屬 *Euryarchaeota* 門，*Methanobacteria* 綱，*Methanobacteriales* 目，*Methanobacteriaceae* 科，*Methanothermobacter* 屬。與編號 Arc 8 和 Arc 9 序列相似度較高之菌株分別為 *Methanothermobacter thermautotrophicus* 和 *Methanothermobacter thermoformicum*。此兩菌株皆為嗜熱性甲烷菌，其生長溫度分別為 65-70°C 和 55°C。

Methanothermobacter thermautotrophicus 為一株僅能利用氫氣作為電子提供者，還原二氧化碳作為生長之方式，屬於自營性甲烷菌(Zeikus and Wolfe, 1972)。而 *Methanothermobacter thermoformicum* 在文獻上指出，該菌株在親源關係與 *Methanothermobacter thermautotrophicus* 很相近，但是它可利用之基質有甲酸(formate)和氫氣/二氧化碳(Nölling and Reeve, 1997)。本實驗在 Bacteria 菌群分析方面並無比對到會產生甲酸之菌株存在，但有比對出會產生氫氣和二氧化碳之菌株存在，故在 Archaea 菌群分析方面，可發現有 *Methanothermobacter* 屬之菌群

是合理的結果。此外在編號 Arc 3 和 Arc 6 為 uncultured *Methanosaeta* 的菌屬，由已知之 *Methanosaeta* 菌屬中，僅有一株嗜熱性甲烷菌 *Methanosaeta thermophila* 該菌株最佳生長溫度為 55-60°C，只能利用乙酸做為生長之基質。Arc 2 和 Arc 7 則為 uncultured *Methanomicrobia* 綱之環境樣品，Arc 5 及 Arc 10 為 uncultured *Methanomicrobiales* 目之環境樣品。在其它樣品比對上，皆是屬於 uncultured archaeon 或者是 clone 所得之序列，因此對其生長特性及分類並無足夠之資訊加以討探。

4.5 嗜熱性甲烷菌之純化分離

本實驗進行嗜熱性甲烷菌之純菌分離，以 TA medium 進行滾管，並使用三種不同基質，分別為甲酸(100 mM)、乙酸(50 mM)和甲醇(50 mM)，但僅以甲酸和乙酸為基質時，有分離出甲烷菌株，甲醇為基質時則是沒有成功分離出。之後再針對甲酸和乙酸所分離之菌株重覆進行滾管分離，從乙酸為基質所分離出之菌株甲烷生成最高濃度僅 11 μmole ，由甲酸為基質所分離出之菌株其甲烷生成濃度最高可達到 22 μmole ，因此後續實驗選取從甲酸分離之菌株作為研究之對象。

從甲酸為基質所分離出來之菌株 THUT3，在位相差顯微鏡下觀察菌相，發現有兩種菌相存在，一為不規則彎曲桿菌，一為

孢頭桿菌，當中以不規則彎曲桿菌為主要的優勢族群，因此又重新滾管分離，但結果仍是無法純化出單一菌相，隨後又添加 100 mg/L 萬古黴素(vancomycin)進行篩選，但仍是無法成功純化。因此，改以無機鹽培養基(MM medium)，進行連序稀釋培養(稀釋倍數從 10^1 - 10^{10})，並將原本甲酸基質改用 H_2/CO_2 取代之，主要是希望藉此方式將非自營性或非甲烷菌株篩除。

最後在稀釋倍數 10^5 得到單純均一之不規則彎曲桿菌，之後以此方式重覆轉植五次，再轉植至含 1 g/L 之 yeast extract 的 TA medium 中，並使用基質甲酸和 H_2/CO_2 進行培養，在位相差顯微鏡下觀察，結果發現孢頭桿菌已經完全被篩除。以甲酸為基質之實驗組在培養 48 小時候所測得之甲烷濃度僅為 5 μ mole，與先前所測得之 22 μ mole 有明顯之差異，也表示先前所分離之菌株可能尚未完全純化。此外，也將培養在含 1 g/L 之 yeast extract，以丙酮酸為基質所培養出之菌株 THUT3 進行 DNA 萃取後，使用針對真細菌(Eubacteria)引子及古細菌(Archaea)引子，擴增菌株 THUT3 之 16S rDNA 確認菌株是否含有其他真細菌存在，PCR 產物大小分別為 1500 bp、1400 bp，以 *Escherichia coli* 及 *M. thermotrophicus* 為對照之菌株，結果如 Fig. 4.6 所示。使用真細菌引子在相同 PCR 反應條件下，只有 *Escherichia*

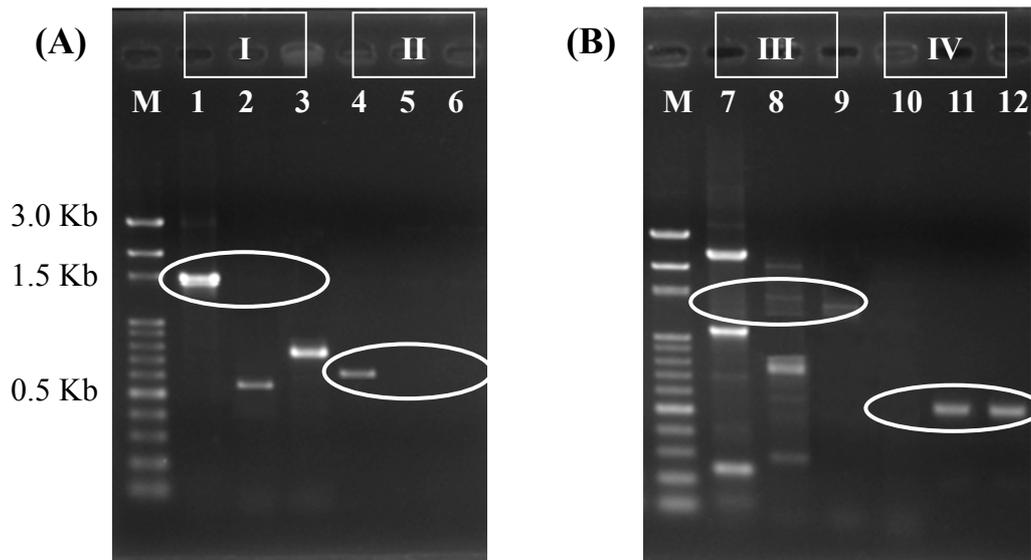


Fig. 4.6. Electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA and variable region fragment. (A) PCR-amplified 16S rDNA and variable region with Bacteria-specific primers. (B) PCR-amplified 16S rDNA and variable region with Archaea-specific primers. M: DNA molecular weight marker, 0.1 k-3.0 Kb. I, III: PCR-amplified 16S rDNA of Bacteria and Archaea domain. II, IV: Nested PCR-amplified variable region of 16S rDNA of Bacteria and Archaea domain. Number 1, 4, 7 and 10: *Escherichia coli*. Number 2, 5, 8 and 11: *M. thermautotrophicus*. Number 3, 6, 9 and 12: strain THUT3.

coli 可得到目標 PCR 產物，而 *M. thermautotrophicus* 與菌株 THUT3 則是分別在約 450 bp 及 750 bp 出現產物片段，但在 1500 bp 的位置並無產物出現。但 *M. thermautotrophicus* 與菌株 THUT3 有非目標產物的出現可能是所使用之引子在甲烷菌之 chromosomal DNA 中有其它相對應之互補序列所造成的。使用古細菌引子所得結果則是僅有菌株 THUT3 有目標 PCR 產物出現，而 *E. coli* 及 *M. thermautotrophicus* 則是無目標產物，*M. thermautotrophicus* 可能是因為 Annealing 溫度過高造成，因為所使用 PCR 條件是以菌株 THUT3 之擴增條件，故可能使得 *M. thermautotrophicus* 在此條件下無目標產物出現。綜合上述之 PCR 結果，並不理想，因此為求慎重改使用針對真、古細菌之 16S rDNA 中之變異區段的引子再進行確認菌株純度之試驗，由於所使用之兩組引子僅擴增變異區段，並不包含 16S rDNA 中的保留區段，故專一性應會更高，PCR 產物大小分別為 600 bp 及 500 bp，結果發現使用真細菌之 nested PCR 引子僅 *E. coli* 在 600 bp 的位置上出現目標產物，而 *M. thermautotrophicus* 與菌株 THUT3 則是沒有任何產物出現，另一組古細菌之 nested PCR 引子所得結果則是 *M. thermautotrophicus* 與菌株 THUT3 在 500 bp 位置上有目標產物，*E. coli* 則是無目標產物出現。因此可確定菌

株 THUT3 無受到真細菌污染之虞。

4.6 分離甲烷菌之定性與鑑定

4.6.1 形態研究

選取出菌株 THUT3，首先對菌株之型態作初步的觀察，包括利用位相差顯微鏡及穿透式電子顯微鏡觀察菌相大小、形狀、移動性、革蘭氏染色和細胞壁結構。

在厭氧環境下，以 MM medium 加入 H_2/CO_2 為基質培養 THUT3，經由位相差顯微鏡觀察結果，其型態呈現不規則彎曲桿菌如 Fig. 4.7，菌體大小約為 $0.4 \times 3-17 \mu m$ ，革蘭氏反應呈陰性，培養 35 小時，觀察到有 aggregate 現象，文獻曾提到部份甲烷菌在特殊環境下如高鹽、高壓等環境時會產生類軟骨素將菌體一隻隻的黏聚起來(賴氏，2006)，此群聚現象可提高甲烷菌對外環境條件改的適應力，避免菌體死亡。而以本實驗所分離出之菌株，是以 H_2/CO_2 作為生長基質，而初始 H_2 之濃度較高，培養至後期 H_2 之濃度減少而導致菌株形成群聚現象。菌株經負染色後，以穿透式電子顯微鏡觀察發現，菌株不具鞭毛(Fig. 4.8)，其細胞壁結構與革蘭氏陽性菌相似，此觀察結果與直接使用革蘭氏染色結果並不相同，但由於甲烷菌的細胞壁結構並不具有肽聚糖(peptidoglycan)，且某些甲烷菌之細胞壁為表面蛋白質

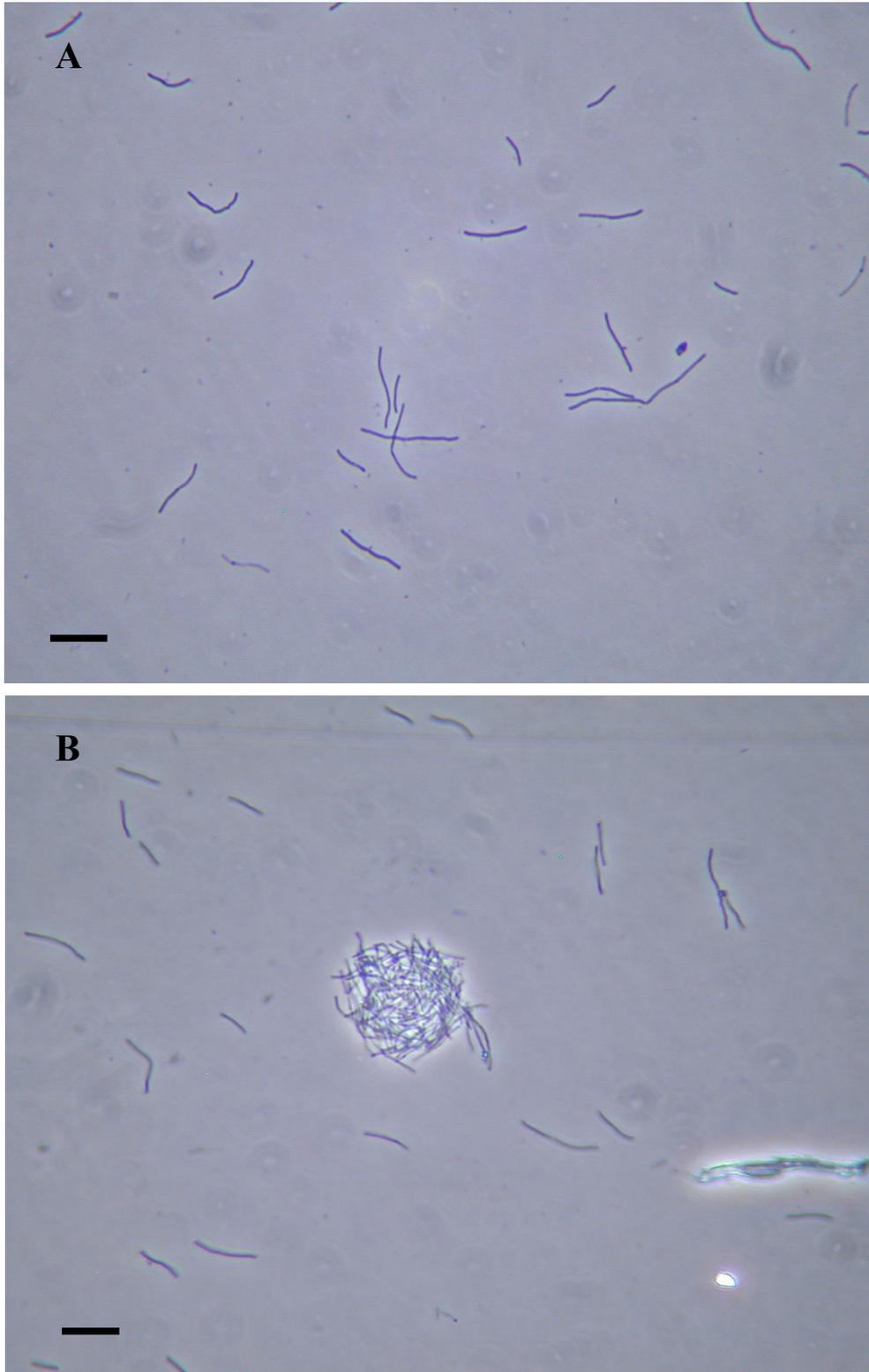


Fig. 4.7 Phase-contrast photomicrograph of strain THUT3. (A): Early growth 21 hours stage of the isolate showing the irregularly crooked rod. (B): Cell aggregate of strain THUT3 formed after 35 hour culture. Bar = 10 μ m.

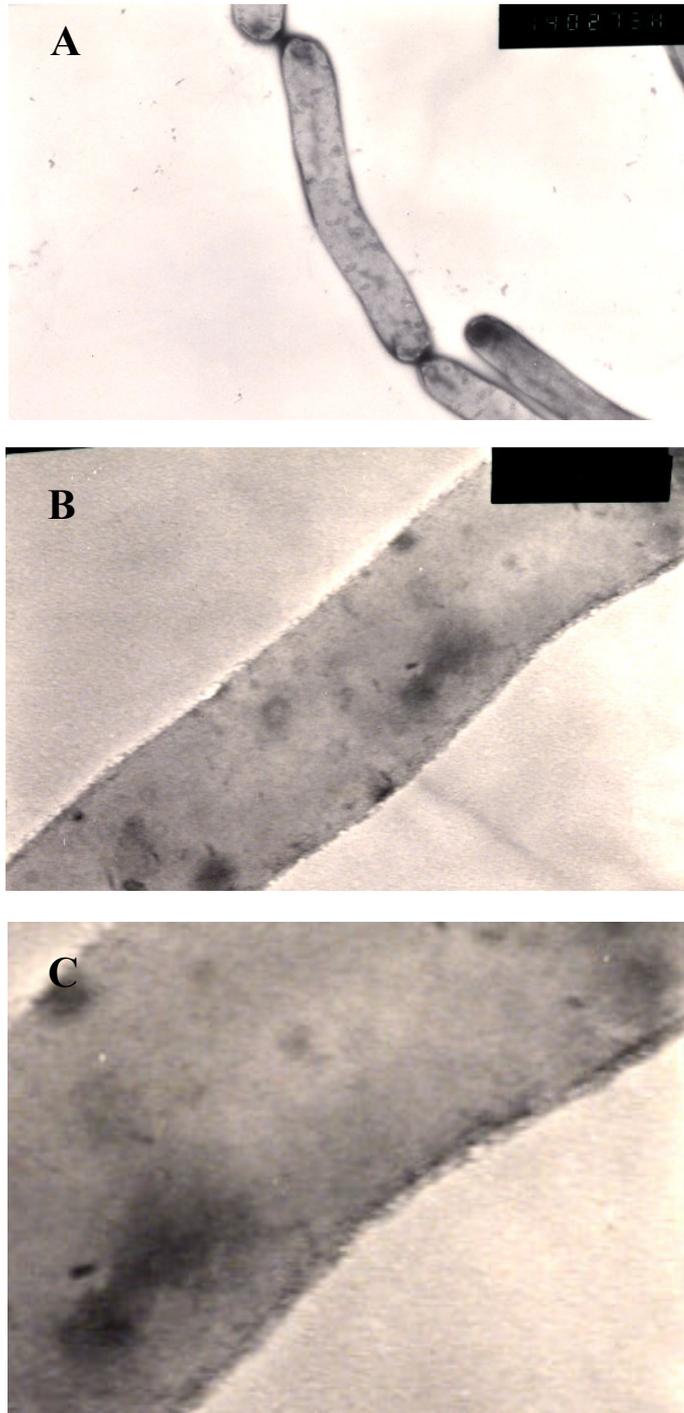


Fig. 4.8 Transmission electron micrograph of a thin section of whole sell of strain THUT3. (A): magnification 14 K. (B): magnification 60 K. (C): strain THUT3 cell wall structure.

(Surface-layer protein, S layer)組成，該結構會影響革蘭氏染色之結果，而少數嗜熱性甲烷菌中，在堅硬的偽胞壁質外還有由蛋白質排列而成的表層，因此可能造成染色結果和以穿透式電子顯微鏡觀察結果並不相符。

4.6.2 16S rDNA 序列分析

菌株之 genomic DNA 萃取出來後，經聚合酶連鎖反應將菌株之 16S rRNA gene 擴增，擴增後之 PCR 產物交由明欣生物科技公司進行定序。定序所得之序列以 BioEdit 軟體進行 forward 端和 reverse 端接合，可得 1303 bp (base pairs)的序列，所得序列結果利用 NCBI 所提供之工具 Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) 進行比對，比對結果如 Table 4.7 所示，分離菌株序列與 *Methanothermobacter* 屬之菌株相似度最高，因此應屬於 *Methanothermobacter* 這個菌屬。之後將該序列資訊保存至 NCBI 資料庫中，其資料庫之 accession number 為 DQ683581。

經 NCBI 比對出相似度最高之菌株後，另選取 *Methanobacteriales* 科的 *Methanobacterium*、*Methanobrevibacter* 及 *Methanosphaera* 屬中的 type species 作為 outgroup 之代表菌株，一同繪製親源關係圖。因為 *Methanothermobacter* 屬在分類上是屬於 *Methanobacteriales* 科，故加入其他屬之菌株一起進行

Table 4.7 Similarity of 16S rDNA sequence of strain THUT3 to *Methanothermobacter* sp..

Isolate	Length of rRNA gene determined	Sequence similarity (%)	Accession No.
THUT3	1303 bp	<i>Methanothermobacter defluvii</i> 1286/1301 (98%)	X99046
		<i>Methanothermobacter thermophilus</i> 1282/1300 (98%)	X99048
		<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> 1247/1261 (98%)	X68720
		<i>Methanothermobacter thermoflexus</i> 1278/1301 (98%)	X99047
		<i>Methanothermobacter marburgensis</i> 1277/1302 (98%)	X15364
		<i>Methanothermobacter wolfeii</i> 1263/1286 (98%)	X89406

分析時，該菌株應該是在 *Methanothermobacter* 屬之 group 外，若和其他菌屬分析後是與 *Methanothermobacter* 屬是同一 group 時，表示分析之序列及方法有誤。本研究中使用 Mega 3.1 軟體內建的 Clustal W 進行分離菌株之 16S rDNA sequence 與相似菌株序列間的 alignment，再使用親源計算軟體 Mega 3 程式，而親源樹中所設定之統計方法及參數如下：距離矩陣法：鄰近連接分析 (Saitou and Nei, 1987) 及 substitution models: Kimura 2-Parameter, Bootstrap Replication: 500。繪製結果如 Fig. 4.9 所示，其他菌屬之甲烷菌明顯在 *Methanothermobacter* 屬之 group 外。與菌株 THUT3 親源較相近之菌株為 *Methanothermobacter defluvii* (X99046)、*Methanothermobacter thermophilus* (X99048) 及 *Methanothermobacter thermautotrophicus* (X68720)，此三株菌分離來源皆是從活性污泥中所分離得到，在基質利用上皆可使用 H_2/CO_2 作為生長基質，*M. defluvii* 與 *M. thermophilus* 及 *M. thermautotrophicus* 進行 DNA hybridization 後，DNA 序列相似度分別為 23 及 39% (Kotelnikova *et al.*, 1993b)，以 16S rDNA 分析上，菌株 THUT3 與此三菌株相似度高達 98%，目前僅知菌株 THUT3 為 *Methanothermobacter* 屬，因此需再更進一步以生化特性作探討後，所得結果和菌株 THUT3 有較相近序列之菌種進行

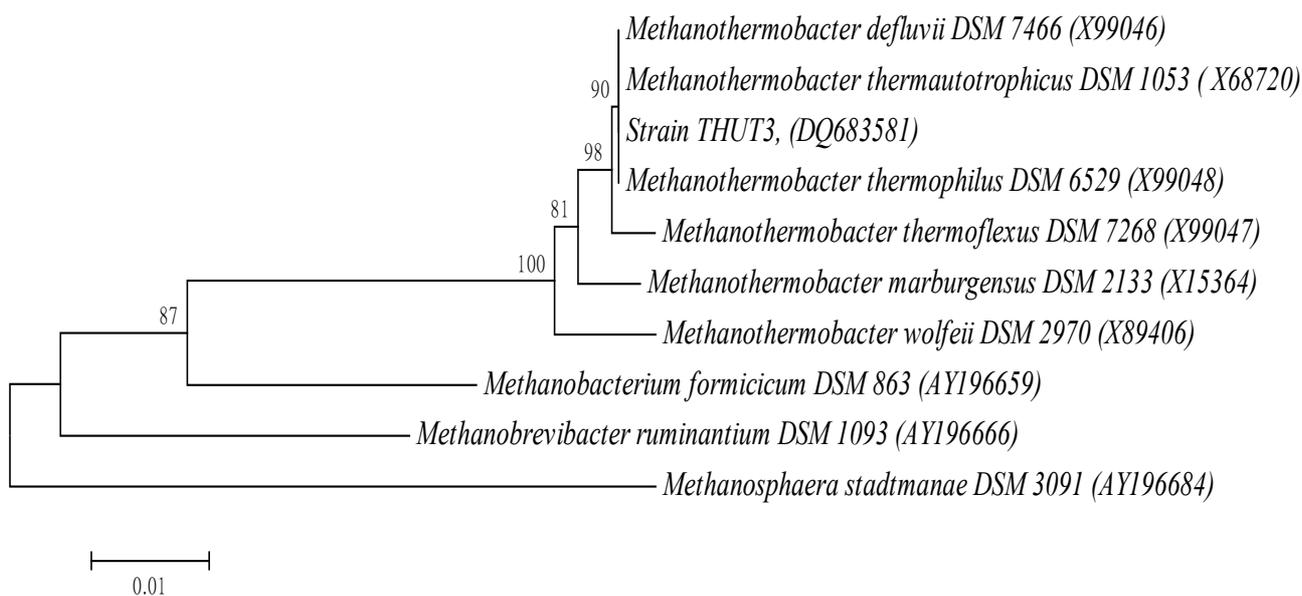


Fig. 4.9 Phylogenetic tree of strain THUT3 constructed from 16S rRNA gene sequence. Sequence accession numbers are show in parentheses. Scale bar indicates 1 substiutions per 100 nucleotides. Genbank accession numbers and culture collection numbers (where available) used in the tree construction are included on the figure.

比較，以利菌種鑑定。

4.6.3 菌株生化特性之探討

為了對分離之菌株之生理特性有更深入之了解，因此對菌株之可利用基質、最佳生長溫度、生長 pH 值、氯化鈉之耐受性和生長因子等生理特性加以探討。

菌株之最佳生長條件以比生長速率和比甲烷產生速率來表示，以菌株之對數生長期之吸光值和甲烷產生量依照式子 4.1 進行換算，可求得在不同培養條件下之菌株生長速率及甲烷產生速率，之後將所得之結果做比較，即可得最佳之生長條件。

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \Rightarrow \frac{dX}{X} = \mu dt \Rightarrow \int_{X_0}^X \frac{dX}{X} = \mu \int_{t_0}^t dt$$

$$\ln X = \mu t + \ln X_0 \dots\dots\dots 4.1 \text{ 式}$$

μ : specific growth rate (h^{-1})

t: generation time

X and X_0 : represent cell concentrations at times t and t_0

4.6.3.1 基質利用

不同菌株對於基質的利用不盡相同，以 *Methanothermobacter* 該屬而言，大多數之菌株僅能利用 H_2/CO_2 作為生長基質，但也有部份菌可利用甲酸為基質，在此研究中也進行其他甲烷生成基質一同測試，觀察菌株 THUT3 對基質的利用性是否與

*Methanothermobacter*該屬之其他菌株有相異之處。基質測試使用之培養基為MM medium，不含yeast extract或peptone，於70°C下進行培養，結果如Fig. 4.10所示，菌株THUT3僅能以H₂/CO₂作為生長基質，其他基質均無法利用。由於菌株THUT3在分離時是以甲酸為基質而分離出，而在此一實驗結果卻發現該菌株無法利用甲酸為基質，在探討其中之原因時發現，在分離時雖然是以甲酸為基質且培養基中添加1 g/L之yeast extract，但此基質利用實驗並無添加1 g/L之yeast extract，推論可能是yeast extract會刺激菌株THUT3對基質的利用性，故再進行另一組有添加1 g/L之yeast extract的不同基質實驗，以觀察yeast extract對基質利用的影響。測試結果如Fig. 4.11所示，添加1 g/L之yeast extract後，明顯刺激菌株對基質之利用性。原本未添加yeast extract之實驗組所不能利用之基質，在添加入yeast extract後皆可利用，除了H₂/CO₂該組外，其他基質均有7 hr之遲滯期，但仍以H₂/CO₂之利用較高，其次為2-propanol，此結果證實yeast extract確實會影響菌株THUT3對基質利用性，但目前並無文獻提出*Methanothermobacter*屬在添加yeast extract後會改變菌株對基質利用性之報告。但有文獻指出部份甲烷菌株會與S organism (“S” stand for “syntrophy”)共生，已知有*Acetabacterium woodii*、以及從1940年所分離之

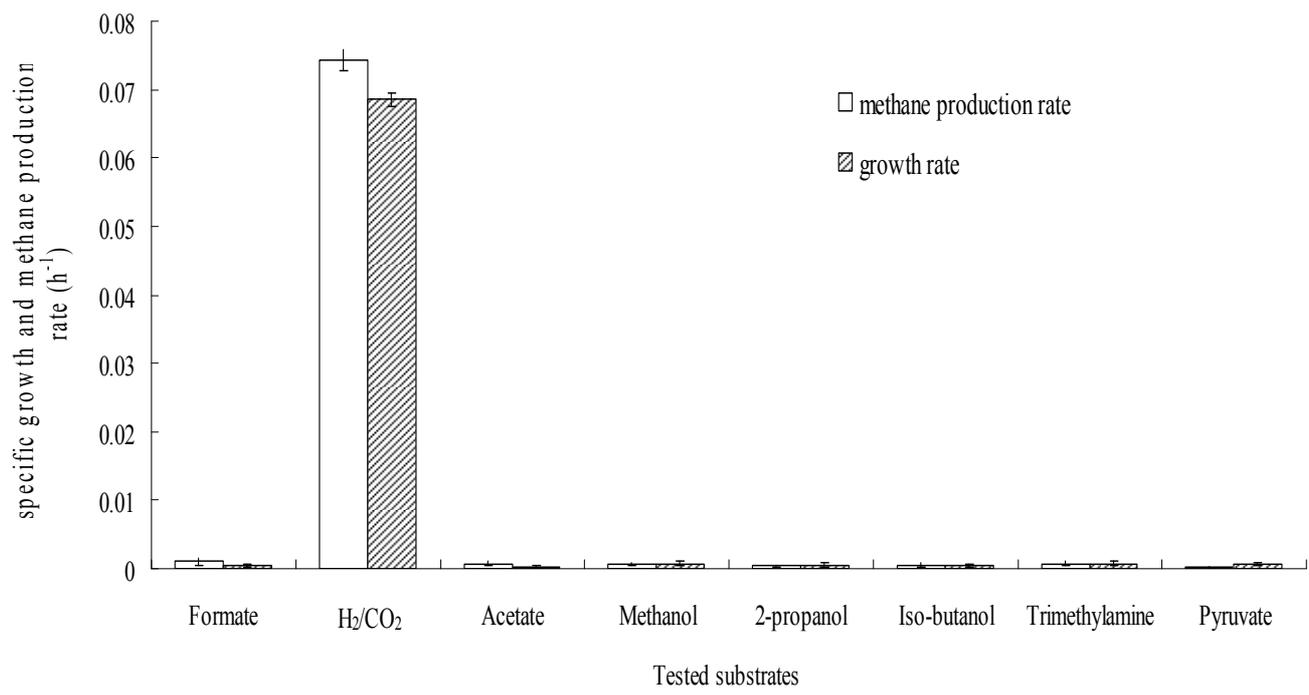


Fig. 4.10 Growth and methane production rates of strain THUT3 with different substrates in MM medium without yeast extract. The pH value of MM medium was 7.0. Cell growth was measured by OD_{600 nm} and methane was measured by GC-FID every seven hours. (n=2)

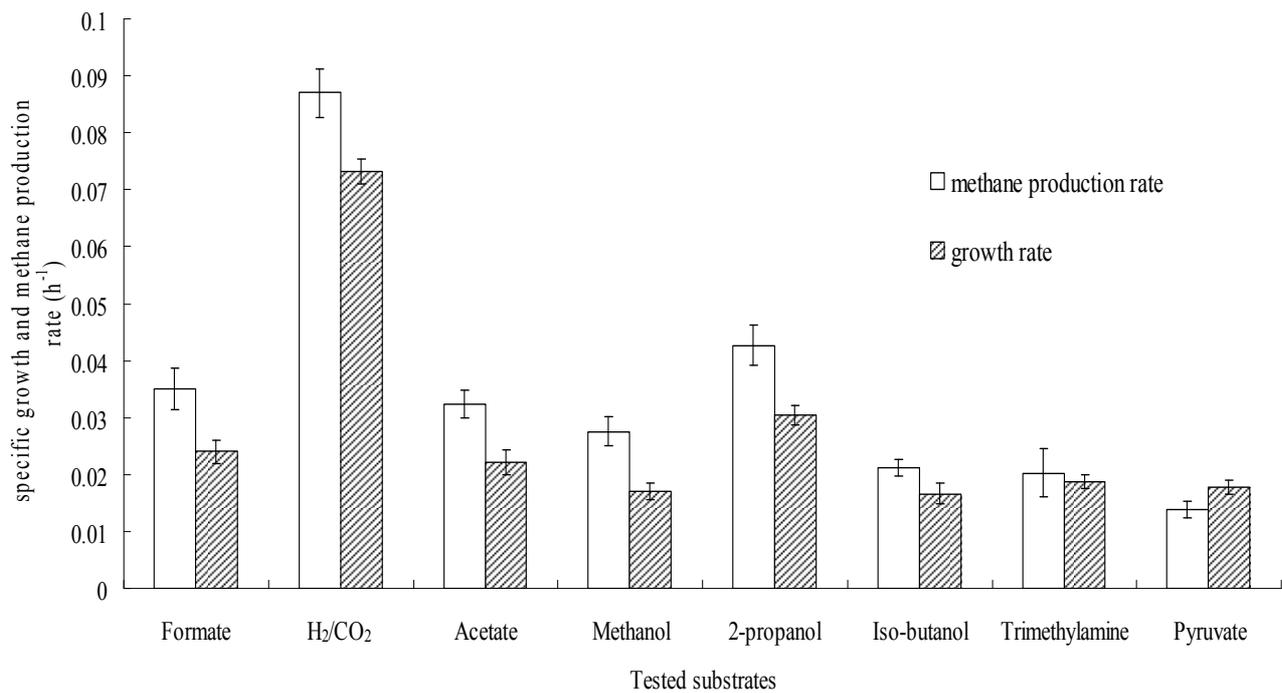


Fig. 4.11 Growth and methane production rates of strain THUT3 with different substrates in MM medium with yeast extract. The pH value of MM medium was 7.0. Cell growth was measured by OD_{600 nm} and methane was measured by GC-FID every seven hours. (n=2)

Methanobacterium omelianskii 中再分離出之 strain S、
Syntrophobacter、*Syntrophomonas*、*Syntrophospora* 等 (Winter *et al.*,
1980; Reddy *et al.*, 1972)。S organism 在分類上是 Bacteria，革蘭氏
陰性菌。S organism 在含 yeast extract 時，會利用 2-propanol、butanol
及 pyruvate 產生 acetate、ethanol、CO₂ 及 H₂，但大量 H₂ 會抑制 S
organism 的生長 (Reddy *et al.*, 1972)。S organism 所產生之代謝物
CO₂ 及 H₂ 可被共生之嗜氫甲烷菌所利用，但菌株 THUT3 是否為這
因素造成此現象尚無法確定，故後續必需再針對基質利用作更進
一步的探討。

4.6.3.2 生長因子

生長因子為可提供微生物生長時所需之物質，其成份大致含
有胺基酸(amino acid)、胜肽(peptides)、維他命(vitamins)等物質，
當中又以維他命 B 群化合物可提供微生物生長所需之營養
(Vasanthi *et al.*, 1996)，有效促進微生物生長，故一般微生物培養
大都添加 yeast extract 和 peptone，但並非所有的微生物生長皆需
要添加。以 yeast extract 和 peptone 成份而言，除了上述成份外，
尚有許多成份目前無法明確了解，但卻是微生物生長時重要的輔
因子，在 4.6.3.1 節結果得知菌株 THUT3 以 H₂/CO₂ 為基質時有
較高之利用率，故本實驗以 H₂/CO₂ 作為培養之基質並添加 1 g/L

之 yeast extract 和 1 g/L 之 peptone 於 70°C 培養進行測試。

結果如 Fig. 4.12 所示，添加 yeast extract 的實驗組其生長及甲烷產生量比添加 peptone 及未添生長因子的對照組要稍高些，其比生長速率及甲烷產生速率分別為 0.085 h^{-1} 、 0.071 h^{-1} ；peptone 之比生長速率及甲烷產生速率分別為 0.063 h^{-1} 、 0.064 h^{-1} ，未添加任何生長因子之比生長速率及甲烷產生速率分別為 0.075 h^{-1} 、 0.063 h^{-1} ，添加 yeast extract 培養之比生長速率及甲烷產生速率比沒有添加之對照組要稍高些，peptone 則是甲烷產生速率比未添加對照組稍低，但比生長速率則是相近。整體而言，在此一實驗中有添加 yeast extract 確實會稍稍刺激菌株之生長但影響不巨，且 yeast extract 並非為菌株 THUT3 生長所必須之物質，因此在後續實驗條件測試與培養皆不添加 yeast extract，以避免分離菌株受到污染。

4.6.3.3 基質共利用 (co- utilized)

甲烷菌培養在可利用基質中，若額外添加入輔助基質時，可刺激菌株之生長，但此種生長機制並非是所有甲烷菌皆有此現象 (Zeikus *et al.*, 1972; Jiang *et al.*, 2005)。本研究根據文獻選用甲酸 (100 mM)、乙酸 (50 mM) 或丙酮酸 (50 mM) 三種基質與 H_2/CO_2 進行基質共利用測試，觀察分離菌株是否會因加入輔助基質而提高

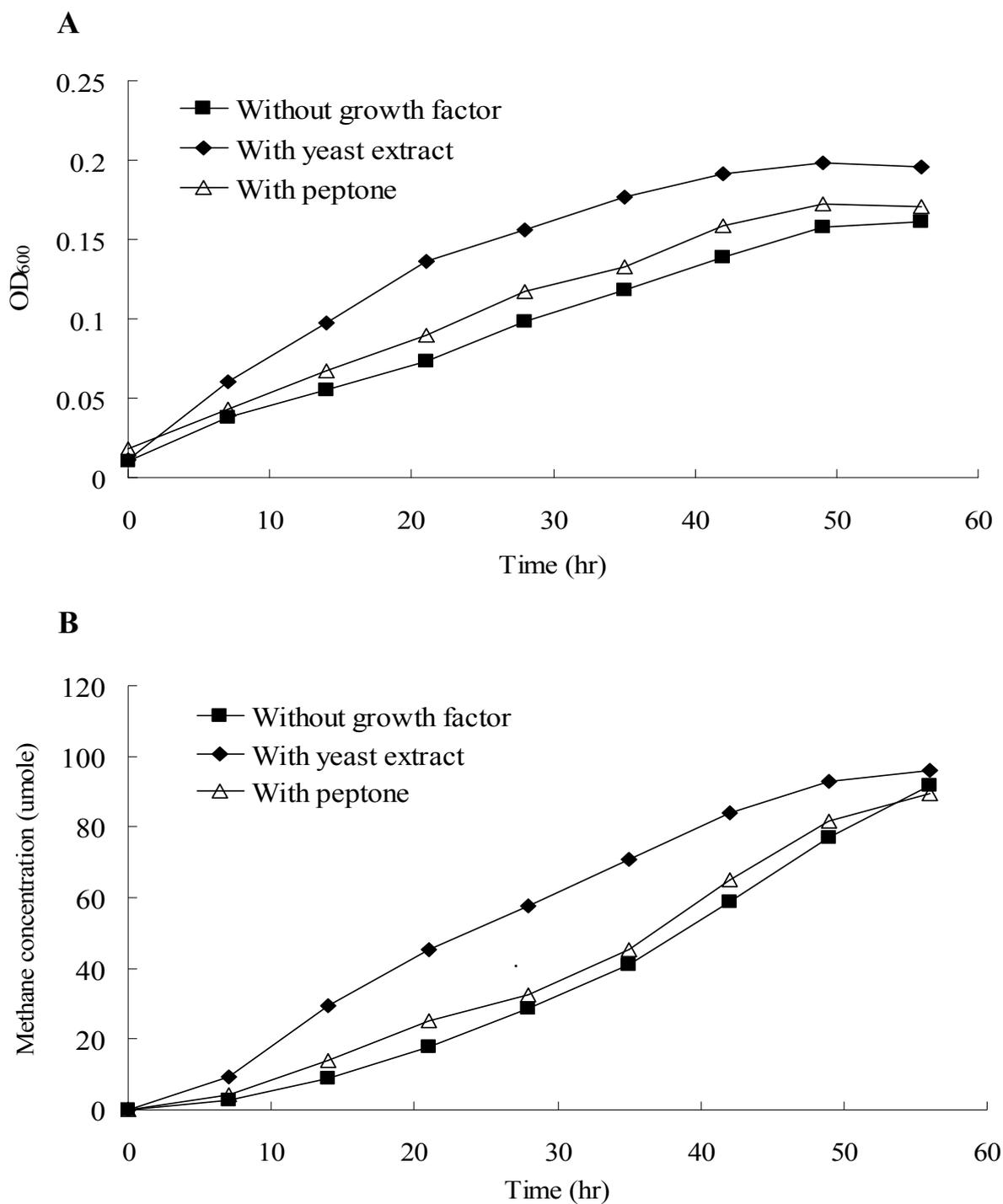


Fig. 4.12 Growth (A) and methane production (B) strain THUT3 in presence of growth factor (yeast extract or peptone). The pH value of MM medium was 7.0. Cell growth was measured by OD_{600 nm} and methane was measured by GC-FID every seven hours. (n=2)

生長速率。結果如 Fig. 4.13 所示，若單獨添加甲酸、乙酸或丙酮酸三種基質而無 H₂ 時(以 N₂ 取代)，分離菌株均無生長及產甲烷之現象。添加輔助基質/H₂/CO₂ 與只有 H₂/CO₂ 比較，並無明顯生長刺激現象發生，表示該菌株僅利用 H₂/CO₂ 作為生長基質，並無利用額外添加之共利用基質，故菌株 THUT3 為一株自營性甲烷菌。

4.6.3.4 最佳生長溫度

微生物之適合生長溫度範圍甚廣，依其最佳生長溫度可分為嗜低溫菌(<20°C)、中溫菌(20-45°C)、嗜熱菌(45-60°C)、極端嗜熱菌(60-80°C)、超高溫嗜熱菌(80-110°C)，在微生物之生理特性為一重要指標。而以目前成功分離出之甲烷菌株其生長溫度大都是在中溫之範圍，而相對嗜熱性甲烷菌之數量要少很多，本研究之菌株在分離及後續培養分別在 55 和 70°C，此培養溫度為嗜熱菌之生長範圍，故在最佳生長溫度測試範圍時選定 45-75°C 作為測試條件，使用 MM medium 及 H₂/CO₂ 為基質培養 56 小時，每 7 小時量測其甲烷及 OD_{600 nm} 變化情形。

由 Fig. 4.14 發現菌株生長隨著溫度升高而逐漸增快，但直至 75°C 時，其生長情形受到明顯的限制，45-55°C 培養時，測其甲烷及 OD_{600 nm} 則有 14 小時的遲滯期，之後才緩慢上升，而培養

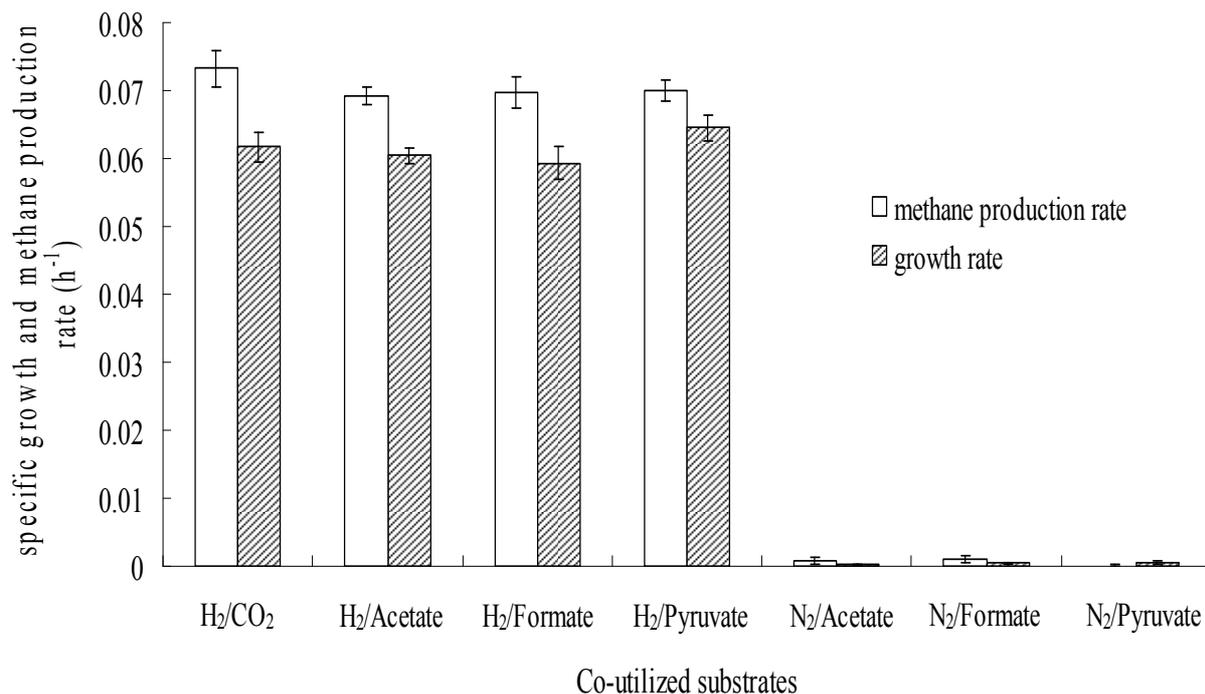


Fig. 4.13 Growth and methane production rates of strain THUT3 at co-utilized substrates. The pH value of MM medium was 7.0. Cell growth was measured by OD_{600 nm} and methane was measured by GC-FID every seven hours. (n=2)

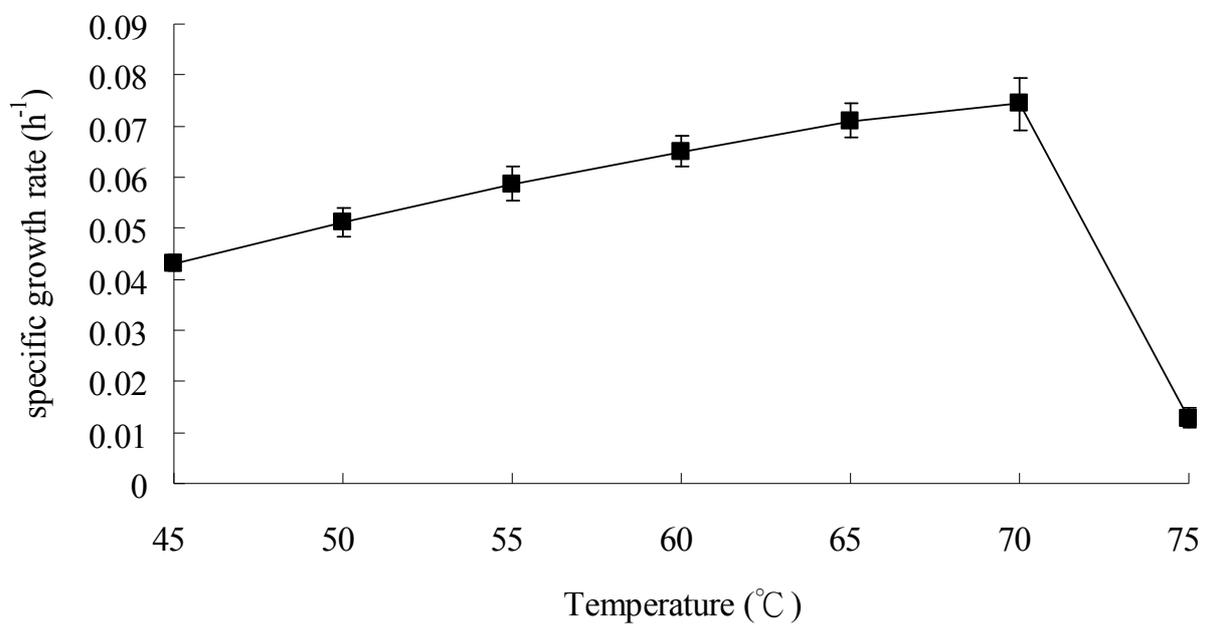


Fig. 4.14 Growth and methane production rates of strain THUT3 at different temperatures. The pH value of MM medium was 7.0. Cell growth was measured by OD_{600 nm} every seven hours. (n=2)

在 60°C 時，生長並無遲滯現象，但培養至 21 小時後，進入對數生長期，培養在 65 及 70°C 時，比生長速率和甲烷產生速率無明顯差異。研究菌株 THUT3 之最佳生長溫度為 65-70°C 之間，在此生長溫度下有最高之生長速率和甲烷產生速率，最大可生長溫度為 75°C。

4.6.3.5 pH 值

由 4.6.3.4 節實驗結果得知，菌株 THUT3 最佳培養溫度為 65 及 70°C，但先前培養溫度皆在 70°C 下，且由比生長速率和甲烷產生速率比較並無明顯差異，故仍選擇 70°C 作為後續實驗之培養溫度。在此溫度下以 H₂/CO₂ 為培養基質，選擇測試之初始 pH 範圍為 5.0-8.0 進行培養，在培養過程中並無控制 pH。以比生長速率和甲烷產生速率測試菌株 THUT3 之最佳生長 pH 值。結果如 Fig. 4.15 所示，該菌株在 pH 5-7.5 範圍之間，均可生長並利用 H₂/CO₂ 產生甲烷，但 pH > 8.0 生長完全受到抑制。隨著 pH 值上升菌株之生長速率也逐漸上升，而在 pH 7.0 時有最佳之生長速率；pH > 7.5 時，生長速率開始下降，故此一菌株屬在中性環境下生長較佳。目前已知之 *Methanothermobacter* 菌種可生長 pH 值範圍為 5.0-8.8 之間，但最佳生長 pH 範圍為 6.8-7.5 之間，若 pH < 5.0 或 pH > 8.0 則會開始抑制菌株之生長。

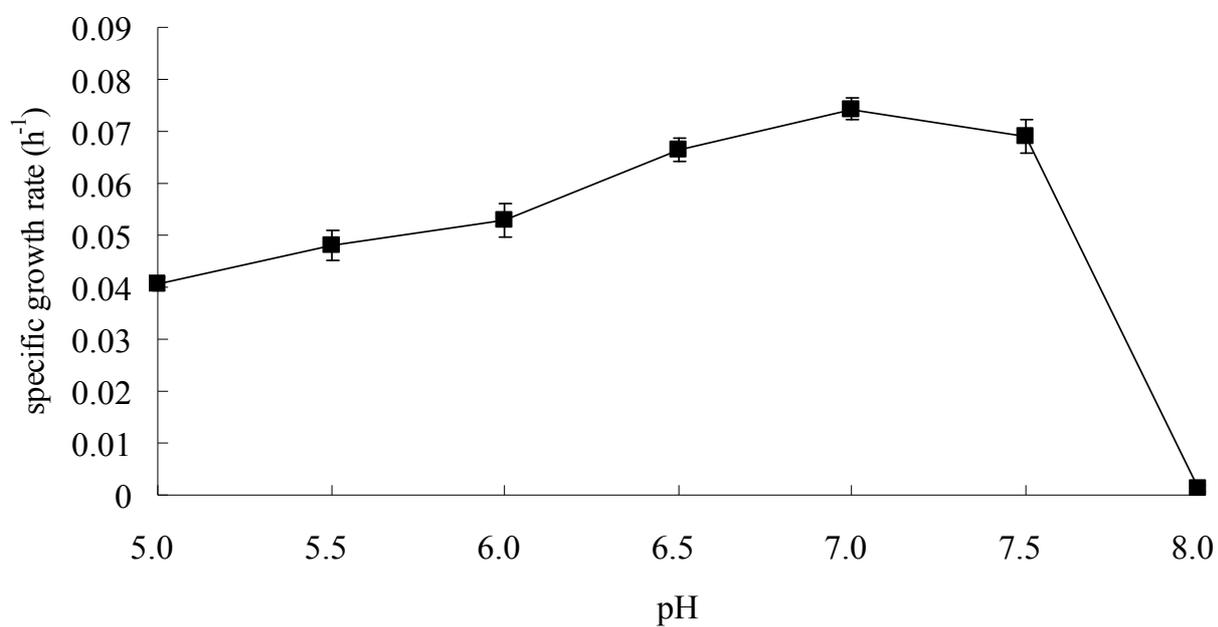


Fig. 4.15 Growth and methane production rates of strain THUT3 at different pH. The isolate was grown in MM medium and incubated at 70°C. Cell growth was measured by OD_{600 nm} every seven hours. (n=2)

4.6.3.6 NaCl 影響

目前發現之 *Methanothermobacter* 當中，某些菌種對氯化鈉有一定程度之耐受性，如 *M. thermautotrophicus* (Zeikus and Wolfe, 1972)、*M. marburgensis* (Laurinavichus *et al.*, 1988)、*M. thermoflexum* (Kotelnikova *et al.*, 1993)、*M. wolfeii* (Winter *et al.*, 1985) 及 *M. defluvii* (Kotelnikova *et al.*, 1993) 等菌株，其最大耐受濃度為 0.5 M。當以 *M. thermautotrophicus* 在添加 yeast extract 情況下對氯化鈉之耐受濃度可提高至 0.65 M，但有將近 8 小時之生長遲滯期，未添加 yeast extract 情況下在氯化鈉濃度為 0.26 及 0.52 M 則分別有 12 和 18 小時的生長遲滯期。在第 4.6.3.1 和 4.6.3.2 節結果得知菌株 THUT3 在添加 1 g/L 之 yeast extract 可增進對基質之利用性，稍微刺激菌株之生長，故本實驗分為兩組，一組為無添加 yeast extract，一組有添加 yeast extract，氯化鈉測試濃度分別為 0、0.25、0.52、0.65 及 1 M，比較比生長速率和甲烷產生速率以測試菌株 THUT3 對氯化鈉之耐受濃度。結果如 Fig. 4.16 所示，未添加 yeast extract 實驗組對氯化鈉之耐受濃度由 0.26、0.52 及 0.65 M 皆可生長，量測 OD_{600 nm} 及甲烷濃度變化時，氯化鈉濃度 0.26 和 0.52 M 生長無遲滯現象，濃度 0.65 M 時則有將近 14 小時的遲滯期，當濃度 1 M 完全抑制菌株之生長，隨著氯化

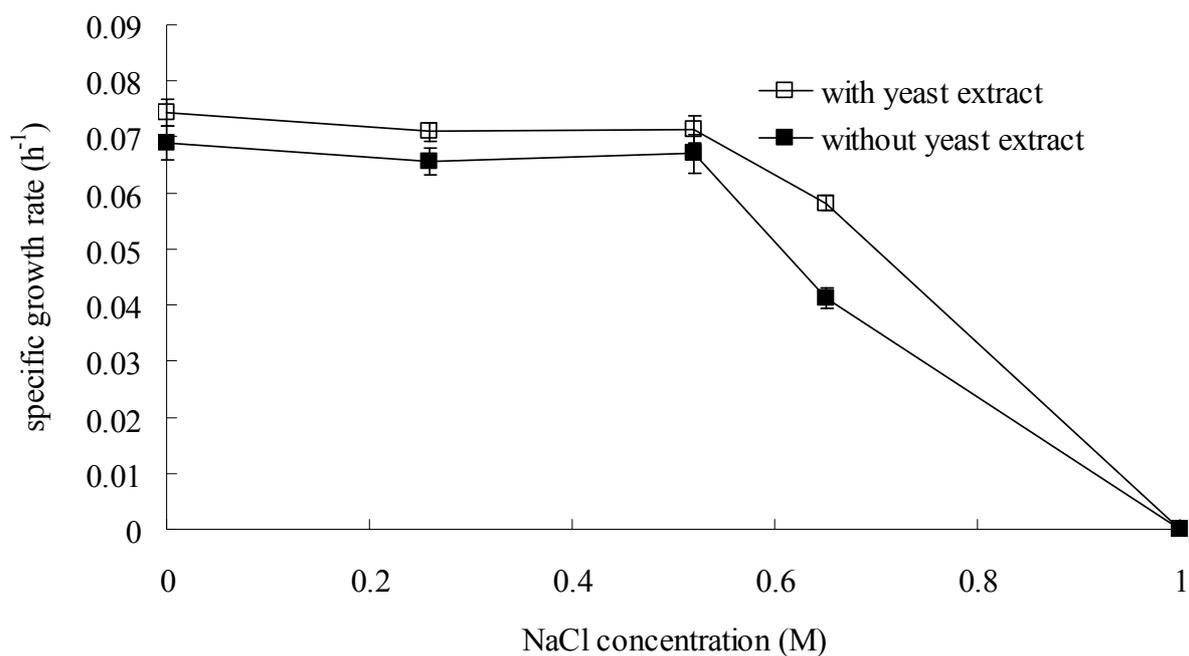


Fig. 4.16 Growth and methane production rates of strain THUT3 at different NaCl concentration. The isolate was grown in MM medium incubated at 70°C. Cell growth was measured by OD_{600 nm} every seven hours. (n=2)

鈉濃度增加菌株之生長速率也隨之下降；添加 yeast extract 實驗組，結果顯示，在 0.26 M 和 0.52 M 濃度下仍是無遲滯現象，量測 OD_{600 nm} 及甲烷濃度變化發現，氯化鈉濃度 0.65 M 的遲滯期在添加 yeast extract 後由原本 14 小時縮短為 7 小時，但濃度 1 M 仍然是完全抑制菌株之生長。以位相差顯微鏡觀察菌株 THUT3 發現在無添加 yeast extract 實驗組中，無添加氯化鈉、添加 0.26 M 和 0.52 M 氯化鈉在培養 35 小時後可發現有群聚現象發生，但群聚現象並無因氯化鈉濃度增加而增加，當氯化鈉濃度達到 0.65 M 時，同樣培養 35 小時後觀察卻無此現象；而有添加 yeast extract 之實驗組，無論有無添加氯化鈉皆無群聚現象出現。此菌株不論無添加或有添加 yeast extract 情況下，仍是以未添氯化鈉的條件下生長最好，且該菌株生長因子不需含有氯化鈉，因此菌株 THUT3 非屬嗜鹽菌，而是屬耐鹽菌。

4.6.3.7 抗生素感受性

古細菌(archaea)部份缺乏細胞壁，或是具有由多醣和蛋白質(但非肽聚醣)組合而成的細胞壁。然而，這些細胞壁確實含有一種類似肽聚醣的物質，稱為偽胞壁質(pseudomurein)。偽胞壁質含有 N-乙醯塔糖胺糖醛酸(N-acetyl talosaminuronic acid)而非 N-乙醯胞壁酸(N-acetylmuramic acid)，因此，破壞細胞肽聚醣結構

之抗生素如 Ampicillin 和 Vancomycin 對古細菌並無抑制作用，但其他抑制機制如 Polymyxin B 會破壞細胞膜之滲透性、Chloramphenicol 抑制 50S 蛋白質合成、Tetracycline 抑制 30S 蛋白質合成及 Rifampicin 抑制 DNA 合成(DNA-directed RNA polymerase)，會依甲烷菌本身之生理特性而有所影響。甲烷菌在分類上，是屬於古細菌成員之一，故本實驗選用上述各種不同作用機制之抗生素進行研究。

由於抗生素在高溫下，會造成本身結構改變，失去抑制作用，因此，本實驗培養在 55°C 下進行，由於添加抗生素後，部份抗生素有抑制作用之實驗組，量測 OD₆₀₀ 變化並不明顯，故量測培養 35 小時後甲烷濃度變化。結果如 Table 4.8 所示，作用機制為抑制細胞壁合成的 Ampicillin 和 Vancomycin 對菌株 THUT3 完全無抑制作用，Chloramphenicol 完全抑制；為了解該菌株對抗生素之最大耐受能力，因此將 Vancomycin、Polymyxin B、Rifampicin 及 Tetracycline 濃度提高至 150 µg/ml 和 200 µg/ml，Chloramphenicol 則是調降測試濃度為 50 µg/ml 和 25 µg/ml。結果顯示 Vancomycin 及 Rifampicin 濃度至 200 µg/ml 仍然無抑制作用，Polymyxin B 濃度至 150 µg/ml 完全抑制(methane concentration: 0.64±0.03 µmole)，Tetracycline 濃度至 150 µg/ml 稍微有抑制作用

Table 4.8 Antibiotic resistance of the strain THUT3 to different antibiotics.

Antibiotic	Highest tested concentration	Methane concentration	Strain THUT3
Rifampicin	100 µg/ml	14.98±0.27 µmole	-
Ampicillin	2 mg/ml	14.50±0.45 µmole	-
Vancomycin	100 µg/ml	15.49±0.37 µmole	-
Polymyxin B	100 µg/ml	3.62±0.07 µmole	++
Chloramphenicol	100 µg/ml	0.39±0.01 µmole	+++
Tetracycline	100 µg/ml	10.63±0.26 µmole	+

++: inhibition; +++: completely inhibition; +: slightly inhibition

(methane concentration: $7.49 \pm 0.04 \mu\text{mole}$)，濃度至 $200 \mu\text{g/ml}$ 則是達到抑制(methane concentration: $2.22 \pm 0.16 \mu\text{mole}$)，Chloramphenicol 濃度為 $50 \mu\text{g/ml}$ 時，抑制作用開始降低，但仍保有抑制作用(methane concentration: $1.23 \pm 0.08 \mu\text{mole}$)，濃度降為 $25 \mu\text{g/ml}$ 則是完全無抑制現象(methane concentration: $14.93 \pm 0.8 \mu\text{mole}$)。以上結果發現菌株 THUT3 對 Chloramphenicol 的抵抗力較差，文獻指出一般甲烷菌對於會干擾或抑制蛋白質合成機制之抗生素較不具抵抗力，本實驗結果與其它之甲烷菌株之測試結果吻合。

4.6.3.8 SDS 感受性

SDS 可溶解蛋白質性細胞壁，在甲烷菌的鑑定上，也會以此作一判斷項目，但 SDS 並非對所有甲烷菌株皆有作用，少部份甲烷菌具有較厚之細胞壁組織，因此對 SDS 就具有較高的感受性，本實驗利用 *Escherichia coli* 及 *M. thermautotrophicus* 為對照之菌株。*Escherichia coli* 為革蘭氏陰菌，其細胞壁含一層磷脂外層及一薄層肽聚糖(murein)，當此結構被破壞後，會造成菌體內之滲壓過大而使細胞撐破；另外選擇 *M. thermautotrophicus* 則是根據文獻得該甲烷菌株含有偽肽聚糖(pseudomurein)構成之較

厚細胞壁，因此對 SDS 具有較高之耐受性。測試結果如 Table 4.9 所示，當 SDS 濃度為 0.01% (w/v) 時，*Escherichia coli*、*M. thermautotrophicus* 及菌株 THUT3 之 OD 值並無明顯變化，當 SDS 濃度提高至 2% (w/v) 時，*Escherichia coli* 之吸光值由 0.43 快速降至 0.12，但 *M. thermautotrophicus* 及菌株 THUT3 仍是無明顯變化，以相差顯微鏡觀察，僅 *Escherichia coli* 的細胞數量在添加 2% (w/v) SDS 後，有明顯的細胞數量差異，*M. thermautotrophicus* 及菌株 THUT3 仍是無明顯差異，由此可得知菌株 THUT3 為具有偽肽聚糖(pseudomurein)之厚壁結構。

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

該實驗測得分離菌株 THUT3 之 genomic DNA 中 G+C 所佔之含量為 59.4%，其值介於 *Methanothermobacter* 屬之 G+C mol% 範圍中(44.7-62.2 mol%)，但其它 *Methanothermobacter* 菌株測 G+C content 的方式是使用熱變性溫度測定法(T_m)，而本研究是使用 HPLC 的標準分析方式測得，故可能會因分析方法不同，造成差異，因此，並無法直接比較，僅能提供一個參考，未來需再以熱變性溫度測定法測定。

Table 4.9 Susceptibility to SDS lysis.

	<i>Escherichia coli</i>		<i>M. thermautotrophicus</i>		strain THUT3	
	initial	After 10 min	initial	After 10 min	initial	After 10 min
SDS conc. (%)	Absorbance					
Control*	0.415	0.413	0.150	0.148	0.138	0.136
0.01% (w/v)	0.552	0.539	0.169	0.167	0.144	0.140
0.2% (w/v)	0.433	0.235	0.142	0.139	0.131	0.129
0.5% (w/v)	0.461	0.134	0.148	0.145	0.143	0.139
2.0% (w/v)	0.427	0.116	0.154	0.144	0.120	0.108

*: nonexposed to SDS.



4.6.5 研究菌株與 *Methanothermobacter* sp. 比較

綜合以上之研究結果，菌株 THUT3 型態屬不規則彎曲桿菌，而根據 16S rRNA gene 序列的比對結果，該菌株與 *Methanothermobacter* 有較高的親緣關係，為了確認本研究菌株是否為新種菌(new species)，除了序列比對結果外，尚對菌株進行生化生理特性研究並與目前已知之 *Methanothermobacter* 屬菌種比較。

目前 *Methanothermobacter* 屬包含 *M. thermautotrophicus*、*M. marburgensis*、*M. thermoflexum*、*M. wolfeii*、*M. thermophilum* (Laurinavichus *et al.*, 1988)及 *M. defluvii* 共六個菌種(species)，每個菌株均有不同生長特性，如 Table 4.10 所示。除了 *M. thermoflexum* 及 *M. defluvii* 可利用甲酸和 H_2/CO_2 之外，其於菌種僅能利用 H_2/CO_2 為基質，菌株 THUT3 特性整體而言與 *Methanothermobacter thermautotrophicus* 的特性較為相近，但仍有少部份特性不甚相符，如 filaments 有無、Gram stain、optimal pH 等。

16S rDNA 序列分析方面，菌株 THUT3 序列相似度與 *Methanothermobacter* sp.較相近(sequence similarity 高達 98%)，以 Neighbor-Joining method 來繪製親源樹(Fig. 4.9)，發現本研究菌

株與 *Methanothermobacter defluvii*、*Methanothermobacter thermophilus* 及 *Methanothermobacter thermautotrophicus* 親源較相近，在生理特性上菌株 THUT3 特性也介於此三株菌種之間，因此可以更加確定本研究之菌株 THUT3 屬於 *Methanothermobacter* 菌屬。

Table 4.10 Differentiation of strain THUT3 and other *Methanothermobacter* species.

	<i>M. autotrophicus</i> Delta H	<i>M. marburgensis</i>	<i>M. thermoflexum</i>	<i>M. wolfeii</i>	<i>M. thermophilum</i>	<i>M. defluxii</i>	THUT3
Source	Thermophilic, Sewage sludge digestors	Mesophilic, Sewage sludge digestors	Sewage sludge digestors	Sewage sludge digestors	Thermophilic, Sewage sludge digestors	Sewage sludge digestors	Mesophilic, paper-industrial wastwater
Morphology	0.4-0.6×3-7 um, rod	0.4-0.6×3-6 um, rod	0.4×7-20 um, rod	0.4-0.6×2.5-6 um, rod	0.36×1.4-6.5 um, rod	0.4×3-6 um, rod	0.4×3-17 um, rod
Filaments	+	+	+	+	+	-	-
Gram stain	+	+	+	+	-	-	-
Catabolic substrates	H ₂ /CO ₂	H ₂ /CO ₂	H ₂ /CO ₂ , formate	H ₂ /CO ₂	H ₂ /CO ₂	H ₂ /CO ₂ , formate	H ₂ /CO ₂
Growth requirements:							
Autotrophic	+	+	+	+	+	-	+
Growth factors:							
Acetate	-	-	-	-	nd	-	-
Yeast extract	-	-	-	nd	nd	-	¹
Coenzyme M	-	-	+	nd	+	+	-
Peptone	-	-	-	nd	nd	-	-
Optimal pH	7.2-7.6	6.8-7.4	7.9-8.2	7.0-7.5	7.5	7.0	7.0
Optimal temp.	65°C	65°C	55°C	55-65°C	57°C	60°C	65-70°C
NaCl tolerance	0.01-0.5 M	0.01-0.5 M	0.02-0.5 M	up to 0.2 M	nd	0.01-0.34 M	0.26-0.65 M
G+C mol%	49 ² , 52 ³	47.6 ²	55 ²	61 ²	44.7 ²	62.2 ²	59.4 ⁴

Symbols: nd; not determined; ¹, not required, but growth and methane production are stimulated in the presence of yeast extract; +, positive; -, negative; ²:

G+C mol% was measured by thermal denatured temperature method. ³: measured by buoyant density ultracentrifuge. ⁴: measured by HPLC.