

## 第五章 結論與建議

### 5.1 結論

本研究由實驗室中所培養出之纖維素降解混合菌群，利用分子生物技術，以變性梯度凝膠電泳法分析嗜熱纖維素降解混合菌群的菌群結構變化，再利用 16S rDNA 核酸序列鑑定。本研究在 eubacteria 方面擷取 9 個具代表性之核酸片段，其編號分別為 Eub 1、Eub 2、Eub 3、Eub 4、Eub 5、Eub 6、Eub 7、Eub 8、Eub 9，經核酸序列間相似度比對後，相似度最高為 0.76，最低為 0.01，表示所有核酸片段無完全相似之序列，在菌種鑑定方面，所擷取之 9 個核酸片段在演化上，與 *Anaerocellum thermophilum*、*Thermoanaerobacter cellulolyticus* 和 *Caldocellulosiruptor saccharolyticus* 的親源關係較相近。

在 archaea 方面擷取 10 個具代表性之核酸片段，其編號分別為 Arc 1、Arc 2、Arc 3、Arc 4、Arc 5、Arc 6、Arc 7、Arc 8、Arc 9、Arc10，其相似度最高為 0.79，最低為 0.11，表示所有核酸片段無完全相似之序列，在菌種鑑定方面，所擷取之 10 個核酸片段在演化上，編號 Arc 8 及 Arc 9 與 *Methanothermobacter* sp. 親緣關係最接近，Arc 1-Arc 7 及 Arc 10 序列與 uncultured archaeon、uncultured *Methanomicrobia* clone 序列和環境樣品相

近，故無法得知這些 DNA 片段之菌株屬性。以

*Methanothermobacter* sp.而言，此菌屬為嗜熱性甲烷菌，基質利用皆可以 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 為主，少部份也可利甲酸為基質，生成甲烷。

uncultured *Methanosaeta* 由已知 *Methanosaeta* 菌屬了解，該屬中有部份菌株為嗜熱甲烷菌，可利用乙酸作為生長基質。綜合以上菌屬之存在，因此本研究菌群能降解纖維素產生甲烷。

本研究在針對 archaea 菌群分析上，發現有嗜熱性甲烷菌屬存在，因此嘗試從中分離甲烷菌，成功分離出嗜熱甲烷菌株 THUT3，經生理及 16S rRNA gene 序列分析後發現，生理生化特性與 *Methanothermobacter thermautotrophicus* 較相似，在 16S rRNA gene 序列相似度方面，與 *Methanothermobacter* 屬中之菌種均高達 98% 的相似度，故依目前之生理特性和序列分析上，僅能得知該菌株是屬 *Methanothermobacter* 屬的一員，但無法判定是否為新菌種。分離菌株 THUT3 之特性如下：

嗜熱性甲烷菌株 THUT3 為不規則彎曲桿菌，革蘭氏陰性菌，具有偽肽聚糖(pseudomurein)構成之較厚細胞壁，不具鞭毛，不具移動性，G+C mol%為 59.4，菌株大小為 0.4×3-17 μm，為一株耐鹽菌，NaCl 最高耐受濃度為 0.65 M，絕對厭氧菌，最佳生長溫度為 65-70°C，最佳生長 pH 值為 7.0，未添加 yeast extract 時僅能利

用 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 進行生長，添加 1 g/L 之 yeast extract 後，仍以 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 為基質之利用較高，其次為 2-propanol，最後才為甲酸、甲醇、乙酸、丙酮酸、異丁醇及三甲基胺。對 Chloramphenicol (100 µg/ml) 不具抗藥性，而對於 Rifampicin (100 µg/ml)、Ampicillin (2 mg/ml)、Vancomycin (100 µg/ml)、Polymyxin B (100 µg/ml) 及 Tetracycline (100 µg/ml) 具有抗藥性。分離菌株 THUT3 依其生化特性，未來可利用在低濃度產氫系統中，因為低濃度之產氫系統，在氫氣回收之成本過高時，則可利用高轉化效率之嗜氫甲烷菌株將其轉化成甲烷，應可提高再生能源之利用性。

## 5.2 建議

本研究菌群分析主要是希望了解纖維降解菌(eubacteria)及甲烷生成菌群(archaea)兩大族群在不同天數下的變化，由於僅利用 DGGE 分析部份 16S rDNA 核酸片段，因此大致只能比對所屬 group。若要更明確了解這些菌種，可藉由整段 16S rDNA clone 分析可得更明確之菌屬，也可與 DGGE 分析所得之結果互相佐證，降低使用單一方法分析所造成的偏差。此外，本研究所分離出之甲烷菌株 THUT3 之生理特性與目前已知 *Methanothermobacter thermautotrophicus* 的特性相似，但在基質利用上發現添加 yeast extract 後可促進該菌株對基質的利用性，

因此未來需針對此現象以  $C^{13}$  標記之基質進行實驗，並分析含  $C^{13}$  標記之甲烷或細胞，來釐清菌株生長是否真的利用甲酸、乙酸等基質進行生長及產甲烷，另一方面必需確認是否有 S organism 存在其中，由於 S organism 代謝 alcohols 或 pyruvate 時會產生 acetate，故可利用 alcohols 或 pyruvate 在含有 yeast extract 之培養基中進行培養後，分析培養基中是否有 acetate 產生，由於甲烷菌並不會產生 acetate 代謝物，故若測得有 acetate 存在，則表示可能有 S organism 與其共生。分離菌株 THUT3 之 16S rDNA 序列也與 *Methanothermobacter* 屬中的所有菌株之序列相似度高達 98%，因此目前僅能了解菌株 T3 確實是 *Methanothermobacter* 屬，但是否為一株新種菌仍需與 *Methanothermobacter* 屬之 type species *M. thermotrophicus* 及其他相似菌株進行 DNA-DNA hybridization 加以確認。