

第三章 材料與方法

3.1 實驗流程

本研究係以混合菌群進行厭氧培養，添加纖維素作為碳源，利用批次的方式，在不同的溫度、pH 值、碳源、氮源、紙類及鹼度的條件下生長，針對纖維素之降解率、中間代謝產物揮發性脂肪酸 (volatile fatty acids, VFAs) 及最終產物甲烷 (methane) 進行分析，探討混合菌群對於分解纖維及甲烷生成之最佳化條件，實驗設計流程如 Fig. 3.1。

3.2 菌種來源

本研究係以中台灣某廢紙回收廠之廢水初沉池水樣做為植種來源。採樣過程首為避免有實驗室微生物污染採樣樣品之虞，先將 1 公升 PE 瓶打開，放置在無菌操作台內經紫外光照射殺菌一小時後，將瓶蓋旋緊，帶至採樣地點進行採樣。採樣之廢水 pH 值為 5.91，溫度約為 36 °C。採樣方式為將採樣瓶裝滿廢水後立即旋緊並放置冰桶內，取回實驗室於 24 小時內進行植種。植種時取 20 ml 水樣置入含有濾紙之 180 ml 厭氧培養基 TA medium (thermophilic anaerobic medium) 中，以濾紙進行增富培養 (enrichment)。

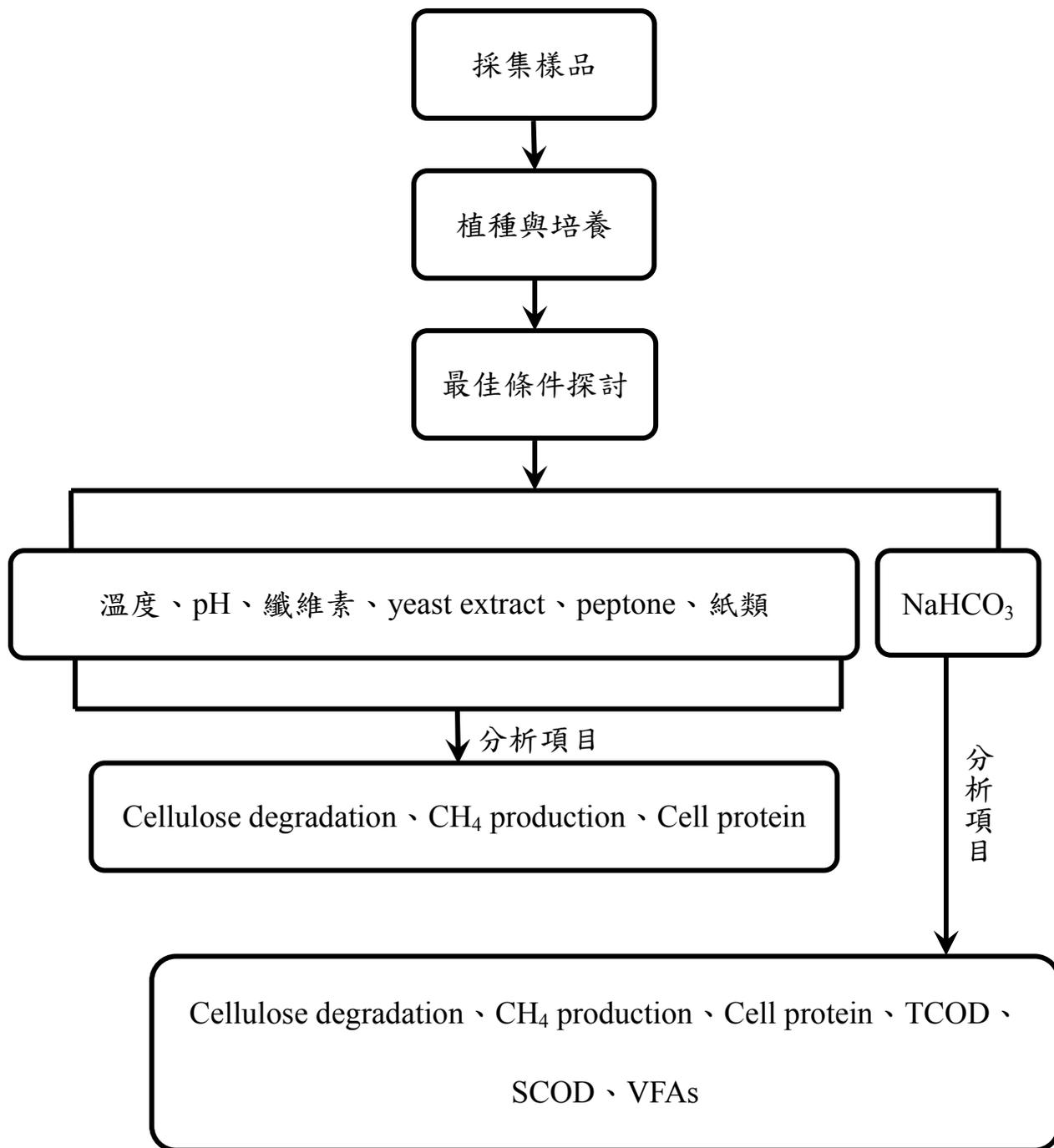


Fig. 3.1 Flow chart of experimental design of this study.

3.3 培養方式

3.3.1 厭氧設

混合菌群之培養方式係以 氧操作 (Hungate station) 維
厭氧 (Fig. 3.2)，進行基 之 置、植種與分析之樣品採集。

氧 為 氧與加 (heating mantle)內之 成氧化
時， 為 ， 加 至 250 270°C 並 入
， ， 氮 混合 過 時，內含的
氧 與 成氧化 ， 用 中的氧 與
，進 無氧的 ， 在 用加 之 先利用
將加 的 ， 入 5~10 分 後 ， 入氮
混合 ， 中的 氧 與 後之 ， 成氧
化 ，進 氧的目的。

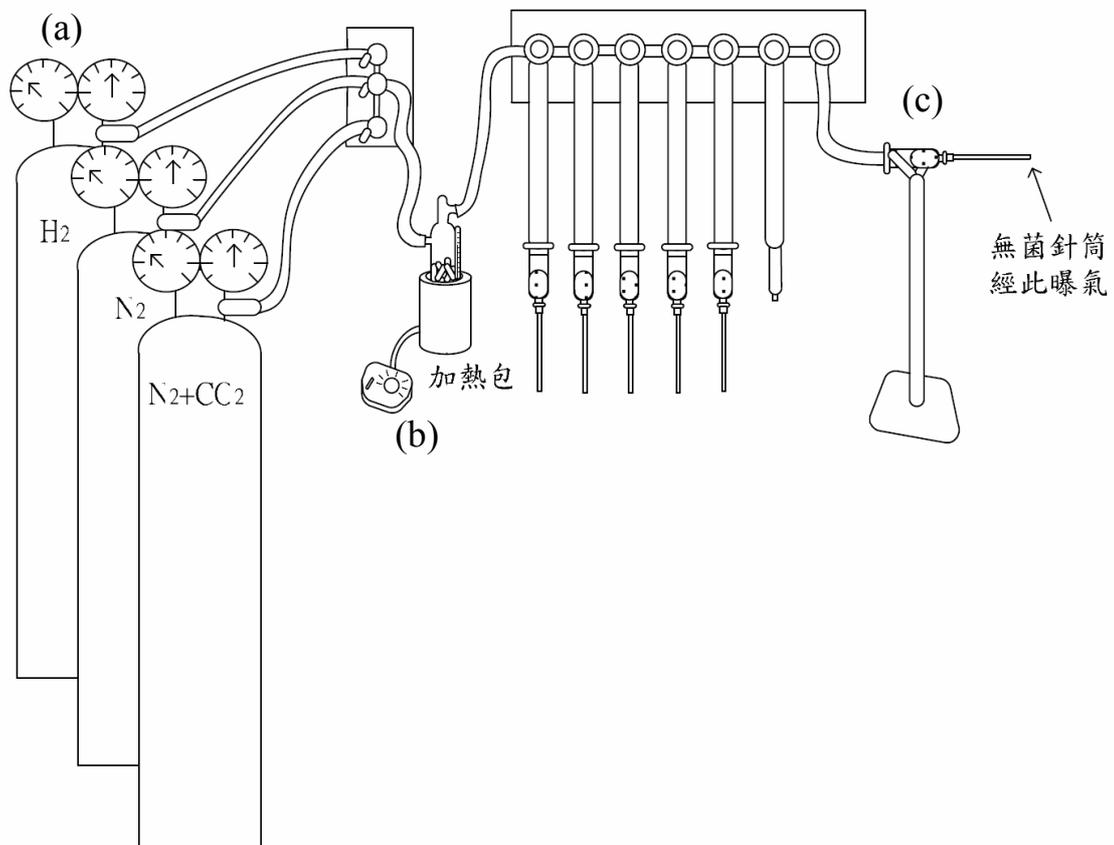


Fig. 3.2 Schematic diagram of the Hungate station. Gases (a) were passed through copper chips in a glass cylinder was heated to 250~270°C with a heating mantle (b) to remove residual oxygen. Oxidized copper chips were reduced by passing H₂ gas through the glass cylinder for several minutes before each use.

3.3.2 培養基 置

3.3.2.1 厭氧培養基 置

以 氧操作 厭氧培養基 (TA medium, Huang *et al.*, 1998), 培養基成 如 Table 3.1 。先取 1 L 水置入 瓶中, 放入 2~3 , 分 加入 1 ml Trace elements, 0.4 g K_2HPO_4 , 0.0005 g Resazurin (氧化), 0.05 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.1 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 及 1 g $(NH_4)Cl$ 。 瓶瓶 入氮 , 後 源, 至室 溫後, 加入 0.5 g L-cysteine 與 3.9 g $NaHCO_3$ 並混合 後 紫 , 時有氧, 氮 成混合 (N_2 $CO_2=80\%$ 20%)維 培養基 中 CO_2 度, 為無 , 時 為無氧。

將 0.2 g 纖維素 0.2 g 濾紙 (0.6 cm)置入三 瓶內, 混合 , 取 90 ml 培養基加入三 瓶中 後, 將 n-butyl stopper 瓶 並以 蓋 瓶, 置入 溫 菌 以 $121^\circ C$ 、1.5 下進行 菌 15 分 。

Table 3.1 Components of TA medium.

Component	Content	Source
Carbon source		
-cellulose, filter paper	2.0 g/L	Sigma, Whatman No.1
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 ^a	0.50 g	Sigma
NaHCO ₃ ^a	3.90 g	Riedel-deHaën
Trace elements ^b	1.00 ml	
Vitamin solution ^{c, d}	10 ml	
Na ₂ S · 9H ₂ O ^d	0.25 g	Riedel-deHaën
Peptone ^d	1.0 g/L	Difco
Yeast extract ^d	1.0 g/L	Difco
Dist. H ₂ O	add to 1000 ml	

^a NaHCO₃ was added after cooling the medium to room temperatures.

^b Component of trace mineral solution was shown in Table 3.2

^c Component of vitamin solution was shown in Table 3.3

^d Sterilized stock solution was added to medium before inoculation.

Table 3.2 Components of trace mineral solution.

Component	Content	Source
conc. HCl	1.0 ml	Riedel-deHaën
NiCl ₂	0.05 g	Riedel-deHaën
EDTA ^a	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	

^a Add EDTA and HCl to some water first.

Table 3.3 Components of vitamin solution*.

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 B12	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	

* Stock vitamin solution was sterilized by passing solution through a 0.2 μ filter. Preparation of vitamin solution was done in the anaerobic hood.

3.3.2.2 與 (cofactor)之

經 菌後之 TA medium 添加 0.25 g/L $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ()、10 ml/L vitamin solution、1 g/L yeast extract、1 g/L peptone (如 Table 3.1) ，以 氧加 裝置 入氮 ，將針 置入 Fig. 3.2 之 (c) ，與氮 進行 置 ， 針 內之 ， 厭氧的 下分 取 100 之 Na_2S 、vitamin solution、yeast extract、peptone 加入 瓶中。

3.3.2.3 植

本研究利用三 瓶以批次方式進行不同條件下的培養， 瓶 8 cm，瓶 度 13.5 cm，以 氧加 裝置 入氮 ，將 針 置入 Fig. 3.2 之 (c) ，與氮 進行 置 。加入 植種之菌 為培養 的 10% (v/v)， 次植種之菌 度為 67 mg/L，在後 實驗中之培養 為 100 ml，培養方 式為 過程中無 。

3.4 不同條件下之纖維素降解

設計不同培養條件下的批次實驗，探討 種培養條件對微生物生長，纖維素降解及甲烷產生的 ，以 最佳化條件 的 性， 以 用在實 的 成 與經 。

3.4.1 溫度

溫度 微生物生長的 性，微生物本 的 素 溫度 化， 的溫度培養 增進菌群的生長與代謝 度。本研究溫度 以 溫菌 (thermophiles)為 ， 溫菌群 有 素， 於 化。 溫菌 最 生長 為 45~80°C， 不 合 過 過 的溫度培養 微生物生長 率 降 ，對於分解基 及產物生成率 之降 ， 設計不同的 溫度培養，探討 混合菌群最 合 (optimum)之培養溫度。將培養 溫度分 設為 45、50、55、60、65、70、75°C。在 一培養溫度 中，分 培養一 植種 及 植種之實驗 ，分 微生物生長、纖維素降解及甲烷生成 。

3.4.2 pH 值

酸鹼度 菌群生長 率 至 生長， pH 值過 之下， 素 ，降 微生物生長的 性， 的 菌為 中性 (Neutrophiles ， 經分析後發 樣培養之混合菌群 含有甲烷生成菌群，一 甲烷菌群在中性 下有 的生長 率， 設計不同的 設計不同的 pH 值 (6.1、6.2、 6.4、6.6、6.8、7.2、7.7、7.8)進行培養 (Table 3.4 ，在 一培養 pH 中，分 培養一 植種 及 植種之實驗 ，分 微生物生長、纖維素降解及甲烷生成 。

Table 3.4 pH ranges of TA medium adjusted by various buffer solutions.

Buffer	Type	pH range	Source
MES ^a	Free acid	5.5~7.0	J.T. Baker
HEPES ^b	Free acid	6.5~8.5	J.T. Baker
Tris ^c	Base	7.5~10.0	J.T. Baker

^a : 2-Morpholinoethanesulfonic Acid

^b : 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

^c : Tris(hydroxymethyl)aminoethane

3.4.3 不同 度之纖維素添加

微生物生長 碳源，在 的添加 之下 進生長，添
加過 的碳源 菌群生長，過 的碳源 成 產物
酸鹼度 降 ， 菌群生長， 不 。本
實驗以纖維素作為 碳源， 的纖維素 纖維分解菌群
分解後，生成 產物， 產物 甲烷菌群利用， 纖
維分解 度外， 甲烷生成 率 之增加， 以不同
度之纖維素進行培養， 微生物對於碳源 度的 度及
，纖維素 度 為 1、2、5、8、10、12、15、20 g/L，在
一纖維素培養 度中，分 培養一 植種 及 植種之
實驗 ，分 微生物生長、纖維素降解及甲烷生成 ，探
討最佳的碳源添加 。

3.4.4 不同 度之 yeast extract、peptone 添加

菌 取物 (yeast extract)與水解 (peptone)為生長
， 菌群 養來源，增進微生物的生長，不 的
添加 度對於微生物生長 產生 作用。
探討最佳的 添加 度， 度 為 0、1、2、4、6、8、
10 g/L 的 yeast extract 進行培養 peptone 度 為 0、1、2、

4、6、8 g/L 的 peptone，0 為不添加。在 一培養 度中，分
培養一 植種 及 植種之實驗，分 微生物生
長、纖維素降解及甲烷生成。

3.4.5 不同紙類之降解

目的廢物中，廢紙類含有 的纖維。廢紙類
分成 回收與不 回收 類。回收類 作為 料 成 生
紙， 回收紙類 紙類、混合紙類、 紙類、 紙類。
利用不同紙類探討本研究之混合菌群對於廢紙類的纖維降解性
以及甲烷生成 率的，以 實 用在分解紙類廢物
的 用性。本實驗分 以添加 8 g/L 之纖維素、濾紙、 紙、
紙、 紙及 作為碳源進行培養，纖維素、濾紙、 紙、
紙及 紙 成 0.6 cm 之 紙， 長度
為 5 cm。在 一培養紙類中，分 培養一 植種 及
植種之實驗，分 微生物生長、纖維素降解及甲烷生成
，探討菌群 以分解不同來源的紙類及 最終產物甲烷之
產生。

3.4.6 不同 度之 NaHCO₃ 添加

在 的實驗 中發 菌群分解纖維素生成之代謝產物， pH 值降 ， pH 值不利於甲烷生成。 有 添 利用加不同 度的 NaHCO₃，以增加鹼度的方式， 甲烷的產率 (Mockaitis *et al.*, 2006)。 本研究針對不同 NaHCO₃ 的 度對於甲烷生成 率之 進行探討，添加 度 為 2、4、5、6 g/L，在 一培養 度中，分 培養一 植種 及 植種之實驗 ，分 微生物生長、纖維素降解及甲烷生成 ，同時 TCOD、SCOD 及 VFAs，酸類產生與 COD 化 。

實驗後發 在最 的 6 g/L NaHCO₃ 添加 度下，有最 率 的甲烷生成， NaHCO₃ 添加 度，以 探討 的 甲烷生成 率及最 的 NaHCO₃ 添加 度， 設計 8、10、12 g/L 的 NaHCO₃ 度 ，在 一培養 度中，分 培養一 植種 及 植種之實驗 ，分 微生物生長及甲烷 生成 。

3.5 分析方法

3.5.1 甲烷分析

本研究利用 析 (Gas Chromatograph Shimadzu, GC-14B), 用 (flame ionization detector, FID) 分析甲烷 (methane), 為 $30\text{ m} \times 0.319\text{ mm} \times 0.50\text{ }\mu\text{m}$ 之 DB-WAX (J&W, USA)。

取 $100\text{ }\mu\text{l}$ 的瓶 (headspace gas), 入 GC-FID 甲 烷, 以 氮為 流, GC 分析條件如 Table 3.5 。

Table 3.5 Program of Gas Chromatograph for methane analysis.

Temperature program		Flow rate	
Injector	200°C	N ₂ *	60 ml/min
Column	40°C	H ₂	60 ml/min
Detector	250°C	Air	60 ml/min

* N₂ was carrier gas.

將 之甲烷 分 進行計 ，計 方式如下。

1. 先 115 ml 之 瓶， 氮 10 min 後，以 n-butyl stopper 瓶 並以 蓋 瓶，添加不同 之 甲烷 (99.9 %, Methane Standard, Supelco) 成不同 度 (10、20 及 30 μmole) 的甲烷 品，取 100 μl 打入 析 ， 的值 過 設 度的 性 ，如 度過 ， 小 度降 。
2. 利用 入的 100 μl 的 30 μmole 甲烷 分 (peak area) (在一 下)，以三 分析，取 值計 樣品中甲 烷 度。
3. 計 甲烷 度
 - a. 甲烷 度 $\text{moles CH}_4 = \frac{\text{Pressure (atm)} \times \text{sample value (100 } \mu\text{l)}}{0.082 \times \text{Temperture } ^\circ\text{K}}$
 - b. $\text{Calibration factor (CF)} = \frac{\left(\frac{\text{moles CH}_4}{100 \mu\text{l}} \right)}{\text{peak area}}$ ， peak area 值。
4. 利用 射針取樣時，先將 ，將針 入培養瓶 後，打開 ，取 100 μl 的瓶 (headspace gas)，將 後，取 針 。
5. 將樣品 入 析 ，分析條件如 Table 3.5，將 的 分 以下 的式 計

a. 甲烷 : moles $\text{CH}_4(100\mu\text{l}) = \text{peak} \times \text{CF}$

b. 瓶 間之 甲烷 :

$$\frac{\text{headspace volume (liters)}}{100 \mu\text{l}} \times \text{moles } \text{CH}_4(100\mu\text{l})$$

3.5.2 揮發性脂肪酸 (VFAs)分析

揮發性脂肪酸以 析 GC-FID (Shimadzu, GC-14B)進行
分析， 為 DB-WAX (J&W GC Column Performance
Summary)， 小為 $30 \text{ m} \times 0.319 \text{ mm} \times 0.50 \mu\text{m}$ 。利用 氮
為 流 (flow rate 為 60 ml/min)， H_2 flow rate 為 60 ml/min ，
air flow rate 為 60 ml/min ， GC 分析條件如 Table 3.6 。

先 揮發性有 酸 品 (Volatile Acid Standard Mix,
46975-U, SUPELCO)分析， 品之成分 成如 Table 3.7 。

品與樣品之 射 為 $1 \mu\text{l}$ 。經 對樣品與 品之分
析 (Fig. 3.3)後發 樣品中含有 度之 酸， 針對樣品
中的 酸進行 分析。

以 酸 (acetic acid, Glacial, J.T.Baker) 成 20 、 40 、 60 、
 80 及 100 mM ，分 以 $1 \mu\text{l}$ 入 析，以 分
成 酸 (Fig. 3.4)。

Table 3.6 Program of Gas Chromatograph for volatile fatty acid analysis.

Injector	Detector	Init/Temp	Init/Time	Program	Final/Temp	Final/Time
230°C	210°C	120°C	0.5 min	20°C/min	200°C	2 min

Table 3.7 Composition of volatile acid standard mixture.

Component	Concentration $\mu\text{g/ml}$ (10mM)
Acetic acid	601
Propionic acid	741
Isobutyric acid	881
Butyric acid	881
Isovaleric acid	1021
n-Valeric acid	1021
Isocaproic acid	1162
n-Caproic acid	1162
Heptanoic acid	1302

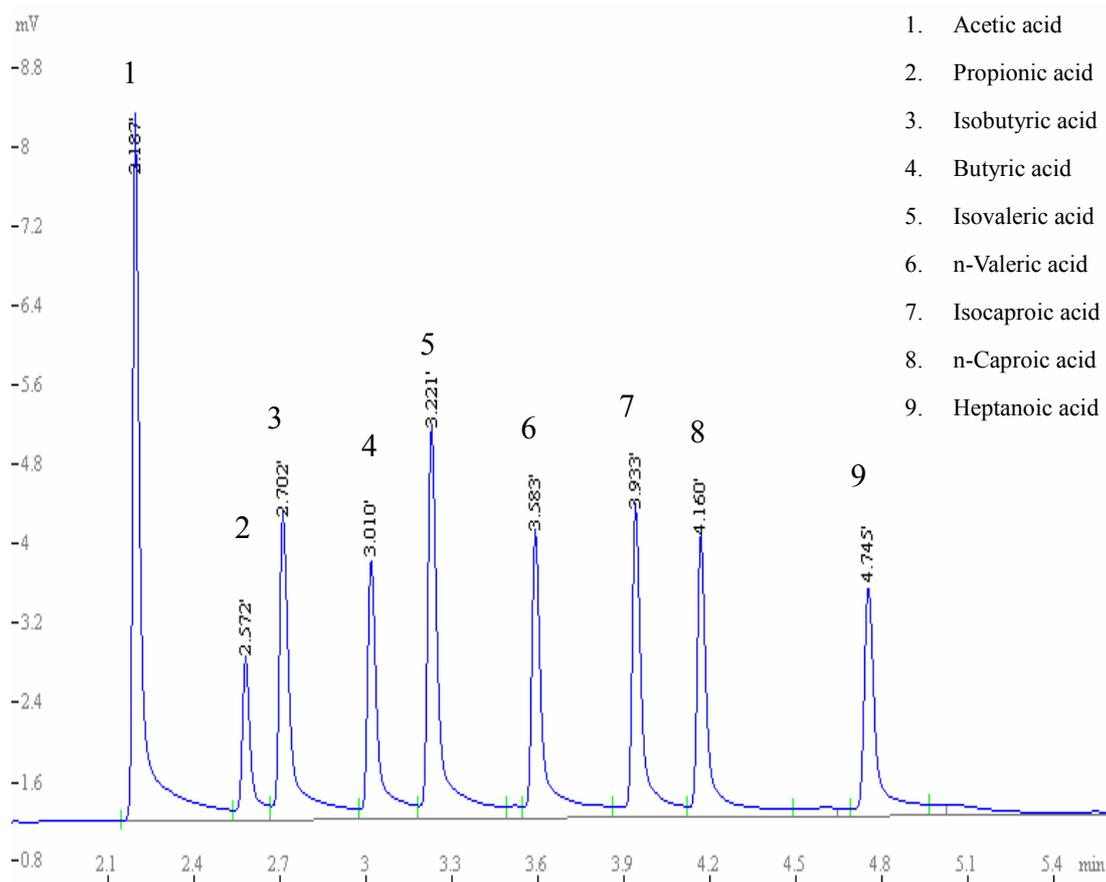


Fig. 3.3 GC-FID Chromatogram of Volatile Acid Standard Mixture (46975-U, SUPELCO). Injecting volume was 1 μ l.

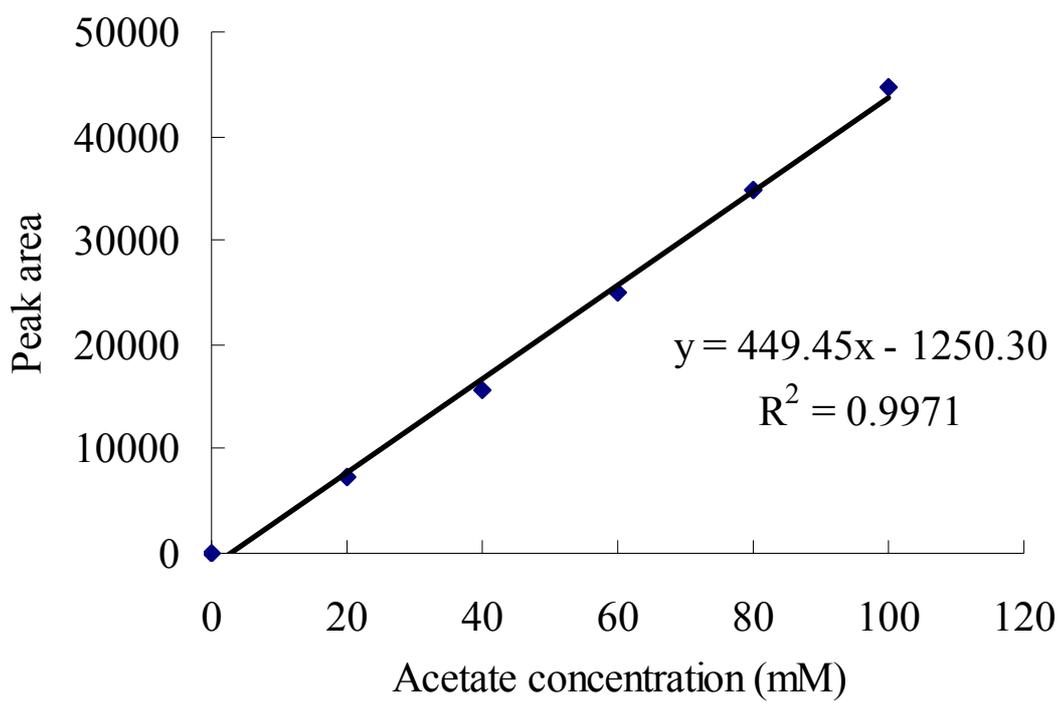


Fig. 3.4 Calibration curve of acetic acid.

3.5.3 纖維素 度

利用 - 酸 法 (Anthrone-sulfuric acid colorimetric method) 纖維素含 (Updegraff, 1969 Viles *et al.*, 1949)。先利用 acetic-nitric acid reagent 將樣品進行 化後，經過 水，以 酸將樣品水解 成 類 (carbohydrate)後，與 (anthrone reagent)，。纖維素含不同，纖維含 時，度 產生的 類，。

分析 如下

1. 先 置 (anthrone reagent)，取 100 ml 酸 (96.4%) 加入 0.2 g 後，小 至 解後，約 小 時後 用。
2. 取 5 ml 的纖維素培養菌 樣品，以 7850×g 15 min (HSIANGTAI, CN-3600)後。
3. 加入 3 ml 酸 酸 (acetic nitric reagent =150 ml 80 % 酸 15 ml 65 % 酸)，混合 後，置於 水 30 min。
4. 以 7850×g 5 min 後，。
5. 加入 10 ml 水，混合 後， 3。
6. 加入 2 ml 67% 酸 (v/v)，混合 後，置一小時。

7. 取 5 之 0.1 ml 至 10 ml (有沉)。
8. 取 1 ml 6 之 ，加入 2 ml 先 過的 ，
混合後，放入冰 內樣品與 。
9. 以 水 (16 min) 後 ， 用冰 (2-3
min)，放置室溫 (5-10 min)。
10. 以 UV/Vis 分光光度計 (UV/Visible Spectrophotometer,
Shimadzu, UVmini-1240)在 620 nm 長下 光值，
纖維素 度。纖維素 時 以不同
 α -cellulose (Sigma) 度作為 品， 度 為 0、0.25、0.5、
1、1.5、2、2.5、3 g/L (Fig. 3.5)， 方法 為 0.12 g
cellulose/L。

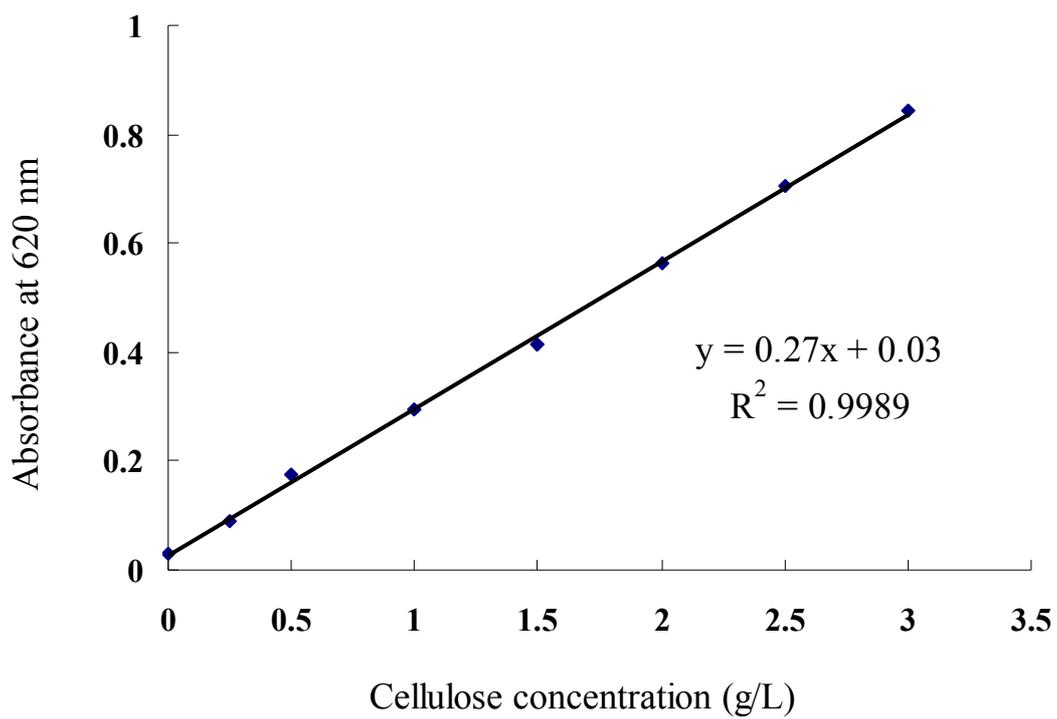


Fig. 3.5 Calibration curve of cellulose in cultural medium determined by Anthrone-sulfuric acid colorimetric method.

3.5.4 微生物 生長

利用 (cellular protein)含 代 生物 (biomass) 的生長 。以 分析 件 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA)，利用 Bradford Method 進行 分析。樣品經過 Tris buffer 後，用 鹼的方式打 ， 在 中， 添加 中 Bio-Rad dye reagent (Coomassie Brilliant Blue G-250) 合 成 (Bradford, 1976)。分析

1. 取 0.5 ml 的菌 ，以 $177\times g$ 10 min (Spectrafuge 16M, C0160)後 。
2. 加入 1 ml Tris buffer (pH 7.6) ， 後 。
3. 2 一次。
4. 加入 0.9 ml Tris buffer (pH 7.6)及 0.1 ml 1N NaOH ， 。
5. 以 $100^{\circ}C$ 加 10 分 ， 後取 0.8 ml ，加入 0.2 ml Bio-Rad dye reagent 混合 。
6. 以分光光度計在 595 nm 長 光值 ， 度。 時以不同 度 (2、4、6、8、10 mg/L)之 (Bovine serum albumin, BSA, Sigma A2153)作為 品， 光值， 成 (Fig. 3.6 ， 方法 為 1.2 mg protein/L 。

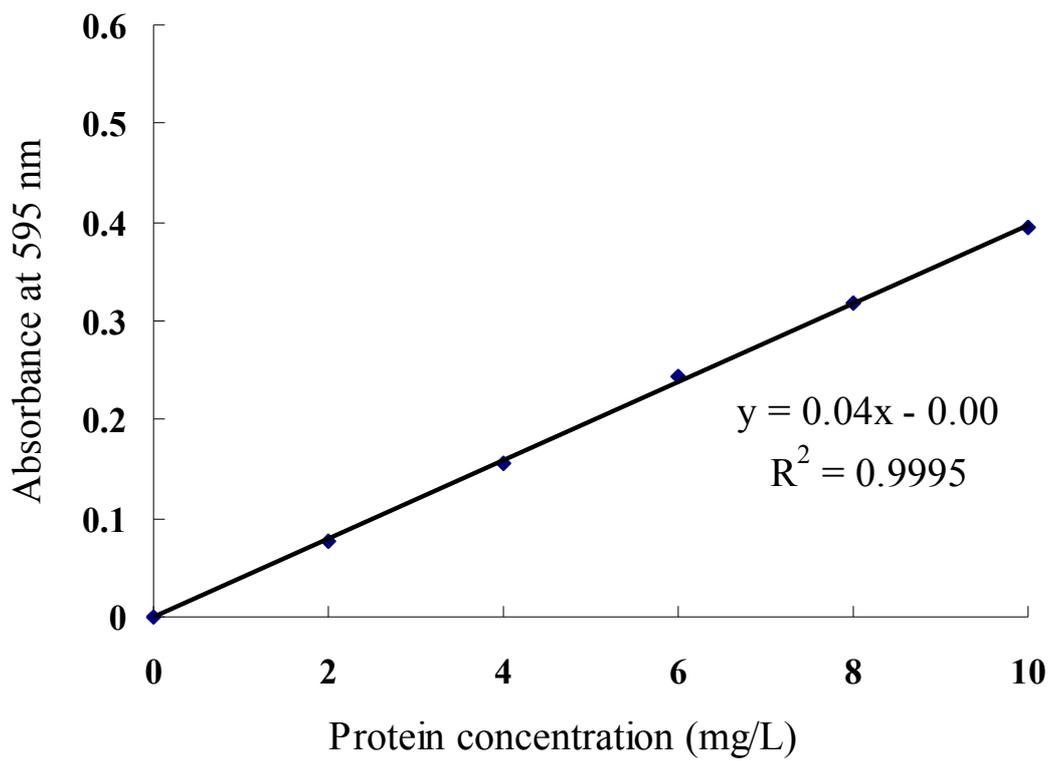


Fig. 3.6 Calibration curve of cellular protein using bovine serum albumin (BSA) as standard.

3.5.6 TCOD 與 SCOD 度分析

以 TCOD 與 SCOD 及不同 度之 NaHCO_3 添加 微生物
降解基 與生成產物 成的 COD ，以 COD
之最佳 NaHCO_3 添加 。以 3.5.3 之纖維素分析 2，將 5 ml
的纖維素培養菌 樣品經 (7850×g ; 15 min)後之 中，取
1 ml 進行 SCOD 的 ， 外 培養瓶中採 1 ml 維素
培養菌 樣品， TCOD。水樣加入過 之 酸 加
流，以 酸 之 酸 ， 的
酸 ，以 COD 度 樣品中 氧化有 物之含 (NIEA
W515.53A)。

COD 方法

1. 酸 之
 - a. 取 10 ml 酸 (0.0417 M)加入 水 至 100 ml
 - b. 加入 30 ml 酸 (96.4 %)，混合
 - c. 至室溫後，加入 2 至 3 (ferroin) 並混
合
 - d. 以 0.25 M 酸 ， 為
時即為終點
 - e. ， 次進行 之 COD 樣品時 ，利用

次 之 酸 度 樣品 COD 度

f. 酸 度 (M) = $\frac{100 \text{ ml} \times 0.025 \text{ M}}{\text{之 酸}}$

2. 取水樣 20 ml

3. 加入 酸 (素) 及 2~3

4. 加入 2 ml 酸 (10 g /1 L 酸), 混合 至

5. 加入 10 ml 酸 (0.0417 M) 後, 加入 28 ml 酸
，混合

6. 放入加 流裝置, 以 150°C 加 流 2 hours 後, 至
室溫

7. 加入 60 ml 的 水, 混合

8. 加入 2~3 之 , 混合 後, 以 酸
並

9. 計 化 氧 COD (mg/L) = $\frac{(A - B) \times C \times 8000}{V}$

A 之 酸 (ml)

B 水樣 之 酸 (ml)

C 酸 之 度 (M)

V 水樣 (ml)