

2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

- 作品編號** 070003
- 參展科別** 微生物學
- 作品名稱** Solar Powering Day and Night with Boxed
Micro-Biosphere
- 得獎獎項** 大會獎 二等獎
突尼西亞I-FEST2正選代表
- 就讀學校** 臺北市立第一女子高級中學
- 指導教師** 李思賢、李宏孝
- 作者姓名** 李芊葳
- 關鍵詞** 微型生態圈、硝化菌、厭氧菌

作者簡介



我是北一女中三年級的學生李芊葳，小學時參加科展的難忘回憶，讓我在高中時再度踏上了科學之旅。延續去年的主題，今年很開心能夠再次參加國際科展，和更多人分享我的研究進展與成果！謝謝李思賢教授和李宏孝老師的指導，也謝謝實驗室蔡語學姊、奕廷學長、孟辰學長、御軒學長及柏宇學長指導我微生物操作技術，讓我進步和成長，完成這份研究，也希望可以為再生能源領域貢獻一份心力，讓研究成果落實在實際應用中！

摘要

本研究在生物光伏電池(Bio-photovoltaics, BPV)的陽極添加能氧化含氮廢物放出電子的硝化菌，並在陰極添加能吸收電子還原硝酸鹽與硫酸鹽產生氮氣與硫化氫的厭氧菌，建立不需外部供給物質，能夠自我維持且不斷發電的微型生態圈(Boxed Micro-Biosphere, BMB)。實驗結果顯示在陽極加入硝化菌後，能使含小球藻與共生菌 Sym1 的 BMB 功率提升 38 倍至 $99.46 \pm 9.31 \mu\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$ ，而在陰極加入厭氧菌能讓功率再提升至 $262.51 \pm 37.30 \mu\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$ ，且此電池截至目前為止已運轉超過 4272 小時，發電功率仍保有 67.4% ($176.98 \mu\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$)。若將 Sym1 與 Sym2 同時加入陽極則可使功率密度提高至 $463.19 \pm 25.50 (\mu\text{W} \cdot \text{m}^{-2})$ ，夜間功率可達白天的 93.1%，但在野外實驗環境下一週內就失去發電能力。若將 BMB 中小球藻換成來自高溫與強酸環境的溫泉藻(H)，其野外平均功率為 $388.80 \pm 14.87 \mu\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$ ，夜間發電量為白天 97.9%，其功率與壽命(目前尚在運作中)遠高於小球藻 BMB。

未來我們將篩選能加強溫泉藻發電能力的共生菌使其更具實用性。

Abstract

In this study, nitrifying bacteria which can oxidize nitrogenous waste and release electrons are added to the anode of Bio-photovoltaics (BPV), and anaerobic bacteria which can absorb electrons to reduce nitrate and sulfate to nitrogen and hydrogen sulfide are added to the cathode to establish a Boxed Micro-Biosphere (BMB) without any external materials support. BMB can sustain itself and generate electricity. Results show that adding nitrifying bacteria to the anode can increase the power of BMB with *Chlorella* and symbiotic bacteria Sym1 by 38 times ($99.46 \pm 9.31 \mu\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$), and adding anaerobic bacteria to the cathode can further increase the power to $262.51 \pm 37.30 \mu\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$. The battery has been running for more than 4272 hours so far, and its power density is still 67.4% ($176.98 \mu\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$). Adding Sym1 and Sym2 to the anode at the same time can increase the power density to $463.19 \pm 25.50 (\mu\text{W} \cdot \text{m}^{-2})$, and the power at night is 93.1% during the day. However, the power generation capacity declined within a week in the field experiment. If the *Chlorella* BMB is replaced with hot spring algae (H) from high-temperature and strong-acid environments, the power in the field experiments is $388.80 \pm 14.87 \mu\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$, and the power generation at night is 97.9% during the day. The life span of Hot spring algae BMB (currently still in operation) is much longer than *Chlorella* BMB.

In the future, we will screen symbiotic bacteria that can enhance the power generation capacity of Hot spring algae to make it more applicable.

壹、前言

一、研究動機

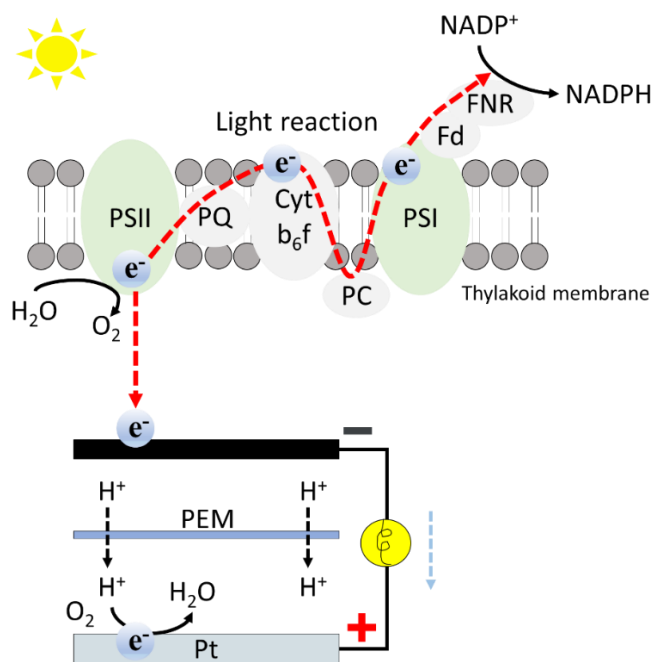
太陽能是地球上單位面積功率最大的再生能源(Barbaro et al.,1981)，也是目前綠能發展的主要選項之一。其中的太陽能光電轉換更是近年來快速發展的再生能源，其具有發電過程不排放溫室氣體，產電高峰與電網用電高峰時間點相近等優點，在太陽能電池性能持續提升、成本日趨下降的今天，矽晶片已經成為太陽能發電最主要的光電轉換材料。預計在 2021 夏天，台灣太陽能的尖峰發電量將超越三座核電廠總和。但矽晶太陽能光電板發電功率會受到光照變化而劇烈波動，在夜間或日全蝕時幾乎無法發電。這導致現今矽晶太陽能發電體系必須搭配昂貴複雜的儲能系統(Vijayakumar et al., 2018; Carrillo et al., 2019)，或是與其他可快速啟動的發電設備(如天然氣火力發電廠)等搭配才能達成穩定供電之目的。因此，開發一種能在夜間持續供電、生產過程更環保的太陽能發電裝置是目前非常重要的課題。

二、背景介紹

(一)生物光伏電池(Bio-photovoltaic, BPV)

BPV 是一種利用生物進行太陽能光電轉換的發電裝置，其主要原理是收集光自營性微生物在光合作用時細胞表面溢散的電子來發電(圖一)。由於能在光照減弱甚至夜間時依然能透過其他代謝途徑所產生的逸散電子代謝來持續發電，能彌補傳統光伏電池無法在黑暗中發電之缺點，且污染較矽晶片低而備受矚目。最早的 BPV 是在 1985 年由 Tanaka 等研究人員所開發的雙槽式生物光伏電池，其電池設計是將藍綠藻培養在陽極槽，利用其在進行光合作用時所產生並溢散到細胞表面的電子來驅動電流產生，同時此種單細胞藻類還會釋出氫離子，陰極槽則設置能催化氧氣與氫離子及電子結合產生水的陰極板來進行還原反應，兩者之間以質子交換膜隔開來平衡兩側氫離子並避免單細胞藻滲漏至陰極區。由於氧氣與氫離子及電子結合產生水的還原電位很高，因此只要位於陽極的光合微生物能持續進行光合作用產生電子與氧氣，此種 BPV 裝置在理論上將能持續不斷產生電力，甚至在光合作用停止的夜間依然能維持一定的產電能力。此種雙槽式 BPV 經歷多

次改良也衍生出多種不同構型(Tanaka et al., 1988; Yagishita et al., 1993)。但由於雙槽式 BPV 裝置需要昂貴的質子交換膜導致其成本難以下降，且此質子交換膜在長期使用下容易因阻塞而造成電池內阻上升、壽命縮短，使得此種設計至今仍難以實用化(N et al.,2018)。單槽式 BPV 則是近二十年來備受矚目的新式 BPV 設計，由於微生物固化處理的技術日趨成熟(rm et al.,2017)，BPV 在設計上已經不須為了控制微生物的分布而使用昂貴的質子交換膜來區隔陰陽兩極，因此單槽設計能大幅降低成本並延長使用壽命。早期的單槽 BPV 雖然發電功率較雙槽式低，但在加入鐵氰化鉀或醌等具有微生物親合性的電子媒介物後已經能有效提升 BPV 發電功率(Rabaey et al., 2005; Marsili et al.,2008)，而在電極板上由於導電玻璃與奈米鉑等催化劑的採用則更進一步提升 BPV 的性能(Mccormick et al., 2011; Bombelli et al., 2011, 2012; Bradley et al., 2013; Sawa et al.,2017; Wenzel et al., 2018; Zhang et al., 2018)。雖然結合上述特點的新式單槽 BPV 能有效提升發電能力，但使用這些改進措施的同時也增加了 BPV 的生產成本，而更重要的是這些經過改良的單槽式 BPV 依然會受到太陽能光照強度變化而導致供電能力大幅波動，阻礙了 BPV 的實際應用。



圖一、生物光伏電池(BPV)產電原理

(二)單細胞藻共生菌

延續去年的研究，為了提升單細胞藻的產電能力並延長 BPV 使用壽命，我們在 BMB

中加入共生菌。共生菌是一群可以與其他生物產生互利共生、片利共生或寄生的微生物，包含好氧菌、兼性厭氧菌與絕對厭氧菌等三大種類。其中好氧性共生菌與單細胞藻類能在氧氣與二氧化碳的循環上形成互補，某些還能提供單細胞微藻所缺乏的維他命 B 群，而其中的亞硝酸菌和硝酸菌更能將水中毒性較高的阿摩尼亞與亞硝酸氧化成硝酸(Croft et al., 2005; Men et al., 2017; Cooper et al., 2019)，而兼性與絕對厭氧菌也常能與單細胞藻類合作完成硫循環與部分的氮循環(Gevertz et al., 2000; Zhang et al., 2019)，這些細菌已經被運用在汙水處理上(Zarezadeh et al., 2019)。而某些藻類共生菌還能藉由分泌天然的電子介體來協助單細胞藻類將多餘電子運輸至特定位置，並可能藉此讓共生菌獲得生存競爭優勢(Ng et al., 2017; Ortiz et al., 2012; Rivas et al., 2010)。去年剛出爐的一份研究報告亦利用藍綠藻及希瓦氏菌(*Shewanella*) 對 D-lactate 的供需建構出能日夜產電的生物光伏電池，但此種流體式生物光伏電池在使用過程中必須不斷補充培養基才能使電池持續維持運作(Zhu et al., 2019)。

(三)硝化作用

BPV 中陽極的單細胞藻與共生菌持續生長後，將伴隨老化與死亡並產生許多含氮與含硫化合物，為了使 BPV 發電能力更加提升，我們在電池中加入市售耗氧性硝化菌來進行硝化作用，這些硝化菌能在有氧情況下，將氨氧化成亞硝酸鹽，亞硝酸鹽再氧化形成硝酸鹽，透過硝化細菌 ammonia-oxidizing bacteria (AOB) 和 nitrite-oxidizing bacteria (NOB) 等的輔助(Winogradsky, 1892)，硝化作用氧化過程中所釋放的電子有可能能夠作為微生物燃料電池中陽極的電子來源(Zhao et al., 2017)，使 BPV 的產電能力得到進一步提升。

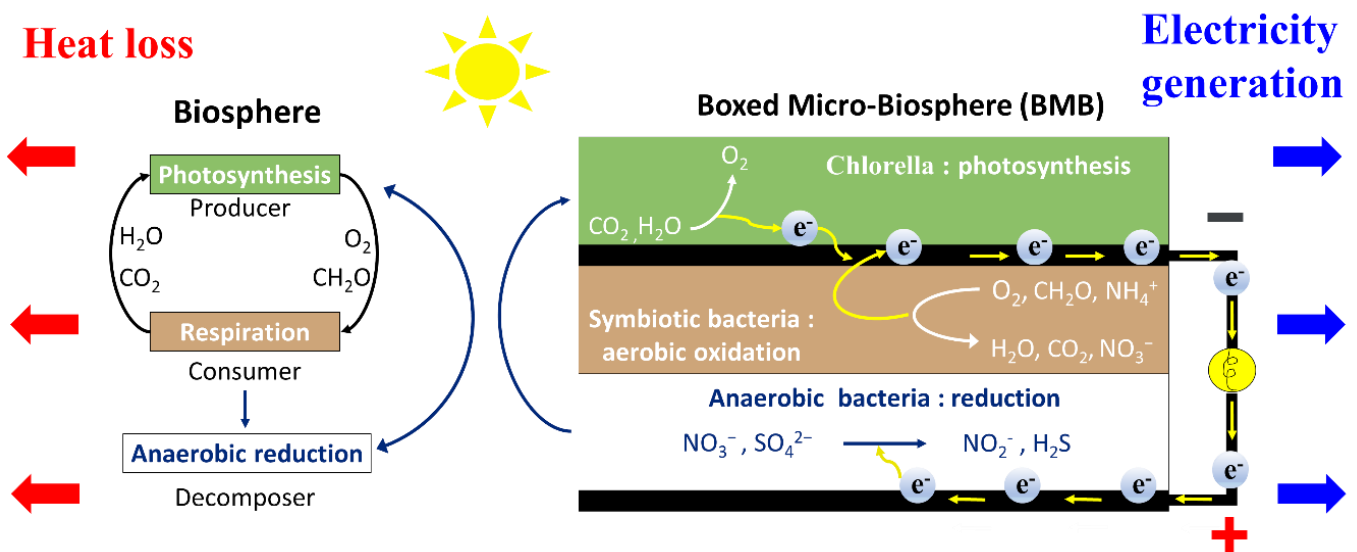
(四)厭氧代謝

長期運作的 BPV 伴隨藻類的老化與死亡將產生許多含氮與含硫化合物，這些物質若無法適當移除將會影響光自營生物的生長。本研究在 BPV 中加入能將藻類代謝產物進行還原反應的脫硝細菌與硫酸鹽還原菌(Dutcanu et al., 2010)，希望這些微生物除了能增強 BPV 產電功率，還能藉此維持電池內的物質循環。為了達到目的，陰極區必須建立缺氧或無氧的條件，使這些脫硝細菌與硫酸鹽還原菌進行還原反應，其中脫硝細菌可將硝酸

鹽 (NO_3^-) 轉換成一系列中間產物 (NO_2^- 、 NO 、 N_2O)，最後還原為氮氣分子 (N_2) (Albina et al., 2019)。而硫酸鹽還原微生物則可將硫酸鹽 (SO_4^{2-}) 還原為硫化氫 (H_2S)，此兩種過程都會消耗電子(Xiang et al., 2017)。透過氮與硫的厭氧代謝，增強陰極的還原力，希望使 BPV 發電效果能更進一步提升。而過量的硫化氫在擴散到陽極區時，又會因藻類產生的氧氣而被氧化成硫酸鹽而被藻類吸收，同時又能放出電子進一步增強產電能力。

三、研究目的

由於之前的研究顯示共生菌有可能提高單細胞藻的產電能力並延長 BPV 的使用壽命。我們希望在新的研究中加入耗氧性硝化菌來提供電池陽極更多的電子，並在陰極區中加入能進行氨氮化合物與硫化物的厭氧代謝反應，透過吸收電子來增加陰極還原力，進一步提高電池發電效能，建構出不需外部供給而能夠自我維持的微型生態圈(Boxed Micro-Biosphere, BMB)，我們希望此一 BMB 能夠在白天透過藻類光合作用以及硝化細菌的硝化作用釋放電子，使 BMB 發電。在夜間缺氧時，陰極區的氮、硫厭氧代謝還原反應吸收電子仍然能夠使 BMB 持續產電。維持 BMB 不論是在日間或夜間均能夠穩定輸出電力，並協助完成電池內部的物質代謝與循環，形成不需外部供給而能夠自我維持的微型生態圈，進一步提升電池的發電功率及使用壽命(圖二)。



圖二、生態圈及微型生態圈(BMB)的物質循環與能量轉換
主要研究目的有下列三項:

- (一)建立由小球藻、共生菌與硝化菌、厭氧還原菌三類微生物為主體之微型生態圈(BMB)，將太陽能轉換為電能的產出，日夜穩定發電。
- (二)透過調整微型生態圈內部的物種，加入硝化細菌與厭氧細菌，以提高 BMB 產電功率，彌補前一年度因電池發電功率較小不易測得之缺憾，並找出最適搭配的 BMB 組合。
- (三)進行長時間運行的 BMB 功率紀錄以及野外太陽光底下的 BMB 功率實測，探討其可能應用與價值。

貳、研究方法與過程

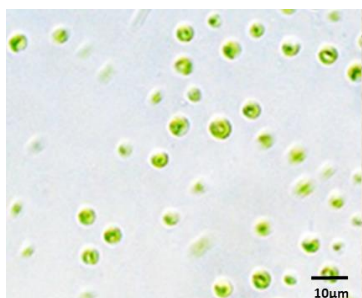
為達成上述三項研究目的，我們依序進行下列實驗工作。

- (一)小球藻與共生菌獲得、培養、染色鏡檢、硝化細菌及厭養細菌取得
- (二)BMB 的設計與建構
- (三)實驗組別設計
- (四)實驗結果的檢測、記錄與分析

1. 實驗材料

藻種

本研究所使用的藻種為淡水小球藻 *Chlorella vulgaris* (購自屏東大洋藻公司)。小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 是一種淡水單細胞微藻，分類屬綠藻門 (Chlorophyta) 四胞藻綱 (*Trebouxiophyceae*) 小球藻目 (*Chlorellales*) 小球藻科 (*Chlorellaceae*) 的真核微藻。小球藻是許多水域常見且重要的初級生產者，其細胞大小約只有 2-8 微米 (μm)，其最適生長溫度約為 24-28°C，最適 pH 值約在 6-8 之間。在陽光及養分充足的條件下，小球藻可在一日之內完成細胞分裂，具快速的繁殖力和旺盛的生命力。目前小球藻也被廣泛應用於水產養殖、畜禽飼料、保健食品等相關產業。



圖三、光學顯微鏡下小球藻的外觀

硝化細菌與厭氧細菌

購買市售 A8349 加拿大 HAGEN 赫根-富濾霸 FLUVAL 硝化菌、市售 A8354 加拿大 HAGEN 赫根-富濾霸 FLUVAL 厭氧菌，加入 BMB 進行功率密度測試。



圖四、市售硝化菌(左)與厭氧菌(右)

細菌培養基

Lysogeny broth (LB):

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
10‰ seawater to	1.0 L

Lysogeny broth plate (LB plate):

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
Agar	12 g
10‰ seawater to	1.0 L

藻類培養基

f/2 Medium:

NaNO ₃ (75.0 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (5.0 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
f/2 Trace Metal Solution	1.0 ml
Filtered seawater to	1.0 L

f/2
Trace
Metal
Solution:

FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.15 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	4.36 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O (9.8 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (6.3 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (22.0 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
CoCl ₂ ·6H ₂ O (10.0 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
MnCl ₂ ·4H ₂ O (180.0 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
Distilled water to	1.0 L

f/2
Agar:

NaNO ₃ (75.0 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (5.0 g/L dH ₂ O)	1.0 ml
f/2 Trace Metal Solution	1.0 ml
Agar	12 g
Filtered seawater to	1.0 L

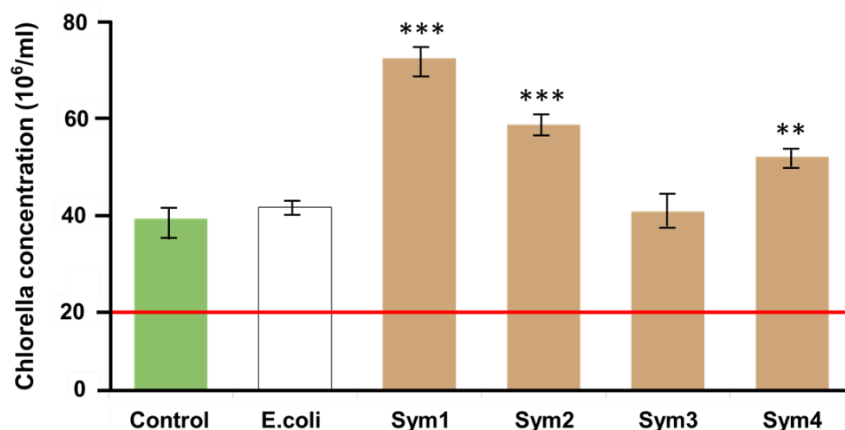
2. 實驗方法

(1) 藻類培養與計數

在室溫下(25°C)以鹽度千分之十的滅菌海水所配置的 f/2 培養基，以 12 小時光照 12 小時黑暗的週期進行照光打氣培養。每 2-3 天繼代一次並使用 80 目、200 目、300 目濾網過濾雜質，由於小球藻培養時間長且須持續觀察調整繼代倍率，因此除在水生生物技術研究室進行培養外，亦在家中利用紙箱、冷氣、檯燈及養魚用電動打氣機組成小球藻培養裝置，其光照強度、光週期、培養基、打氣量與溫度皆與研究室中藻類培養箱相同。藻濃度則以血球計數盤進行計算。

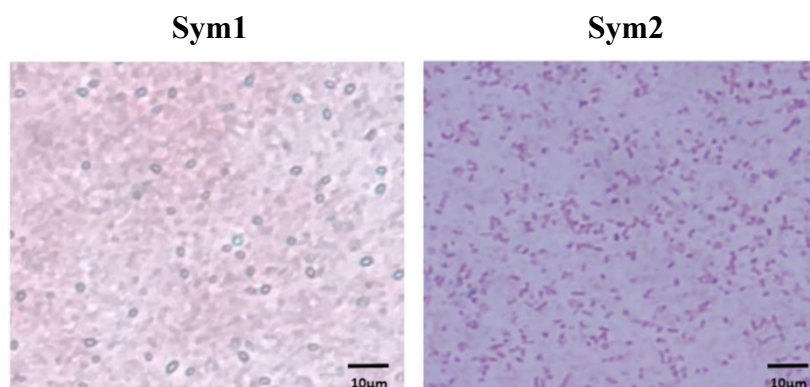
(2) 共生菌挑選、培養與染色鏡檢

本研究所使用的共生菌是之前由培養四週以上之小球藻培養液中獲得，利用四區畫線的方式塗抹在 LB plate 上，在 28°C 下培養 24 小時後，從盤上挑選外觀有明顯差異的單一菌落做純化培養。將各菌株純化培養後分別塗抹在含有小球藻的 f/2 Agar plate 上進行篩選，並以液態共培養方式觀察小球藻的生長速率(圖五，前人所著)，篩選出能促進小球藻生長的菌種並進行革蘭氏染色與鏡檢(圖六，前人所著)。本研究即以此為基礎，將其中兩種小球藻共生菌(Sym1, Sym2)以 LB plate 培養 16 小時後放入微型生態圈進行電壓、電流偵測與紀錄。



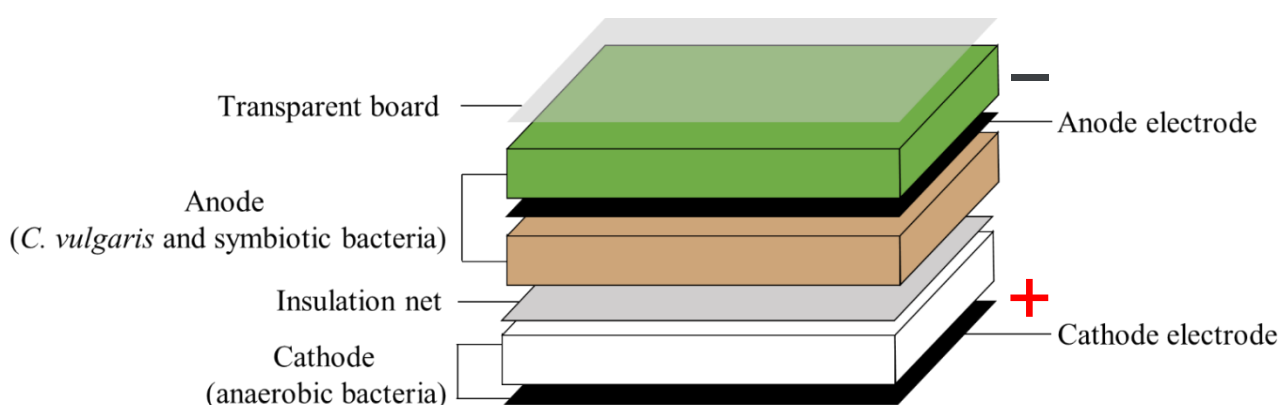
圖五、共生菌對小球藻成長速率之影響(前人所著)。從左到右分別是沒有加菌的控制組 (control 綠色)、作為對照組的大腸桿菌:E.coli、四株篩選自藻培養液的共生菌：Sym1、Sym2、Sym3、Sym4。紅線為實驗起始之藻濃度(2×10^7 cells/ml)。數

據分析:P 值>0.05 視為與 control 無顯著差異, 0.05>P 值>0.01 視為與 control 有顯著差異(*), 0.01>P 值>0.001 視為與 control 有更顯著差異(**), 0.001 >P 值視為與 control 有極顯著差異(***)。



圖六、Sym1 與 Sym2 革蘭氏染色(前人所著)。

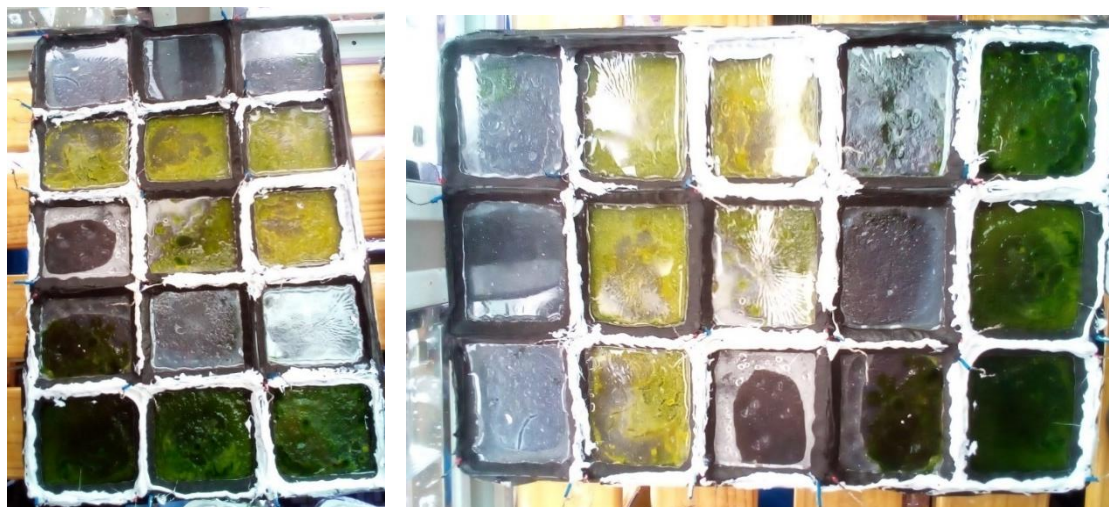
(3) 微型生態圈(BMB)設計與組裝



圖七、BMB 裝置圖

上圖(圖七)為本研究所設計的 BMB 裝置圖。陰極、陽極皆為面積 $6.0 \times 7.0 \text{ cm}^2$ 的 SUS 304 不鏽鋼網電極板, 孔徑為 100 目。絕緣網是尼龍製的 80 目濾網, 位於陰極區上方, 目的是為了防止陰陽極電極板接觸造成短路。陽極區由 15 ml 的 f/2 Agar、小球藻及特定共生菌, 硝化細菌與電極板組成, 陰極區由 15 ml 的 f/2 Agar、

厭氧細菌與電極板組成。其中小球藻濃度為 1×10^7 cells/ml，共生菌、硝化菌、厭氧菌數量為 0.5 ml OD₆₀₀=1 的菌液。最外側以透明膠片覆蓋，並以矽膠密封(圖八)。



圖八、BMB 實作照片

(4) 實驗組別設計

—	+	(— - +)
Anode	Cathode	Combination
X	X	X-X
N	A	N-A
C + N	A	CN-A
C + 1 + N	A	C1N-A
C + 1	X	C1-X
C + 1 + N	X	C1N-X
C + 2 + N	A	C2N-A
C + 1 + 2 + N	A	C12N-A
H + 1 + 2 + N	A	H12N-A
H + N	A	HN-A

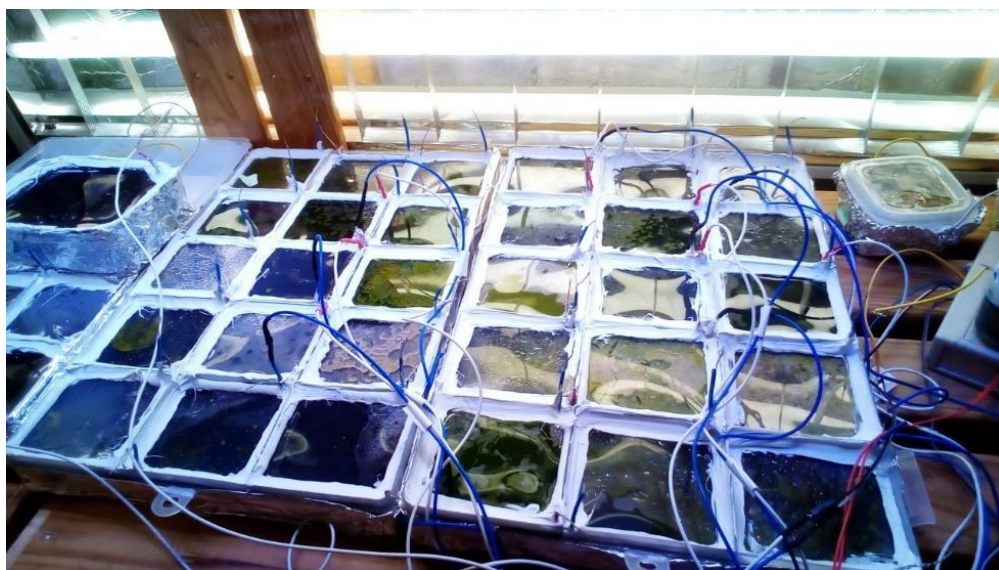
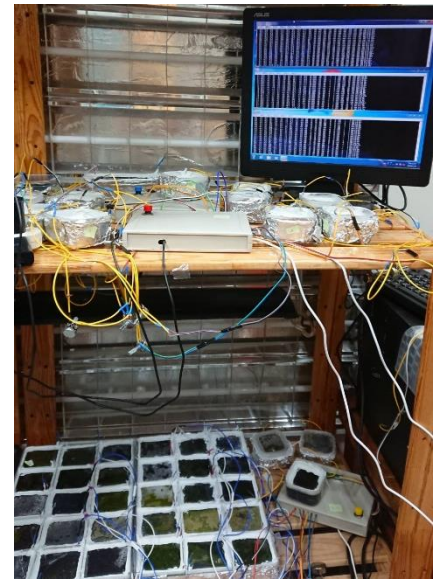
表一、實驗組別設計。C:小球藻。1:共生菌 Sym1。2:共生菌 Sym2。N:硝化菌。A: 厭氧菌。H:溫泉藻。

(5) 電壓電流量測與分析

延續前一年度之研究結果，除測量電壓外，新增電流與功率紀錄，更完整測試電池性能。將各組電池置於光照強度 677 lux，攝氏溫度 27 度，光週期為 12 小時光照 12 小時黑暗的環境下進行電壓電流量測，計算功率密度數值。各電池分別與十通道微電壓微電流量測儀(圖九)以夾式接頭連接，並透過 USB 介面與電腦連接記錄數據(圖十)。每一小時採樣一次，所得數據以 SigmaPlot 和 Excel 製作成折線圖分析。



圖九、十通道微電壓微電流量測儀與運作狀況



圖十、BMB 功率密度實測圖

參、研究結果與討論

由於在前一年度的研究結果中發現電池深處陰極區長出的紫黑色菌落可以使 BMB 電壓提升，且此一菌落會散發類似臭雞蛋的刺鼻味道，推測可能是由厭氧性細菌產生的硫化氫。但當時的 BMB 發電功率極低，因此本研究為了提高發電功率，嘗試以人工接種方式將市售厭氧菌加入 BMB 陰極。另外 2017 年由 Zhao J. 等人所發表的文獻發現：硝化作用能放出電子，可能協助作為電池陽極的電子來源，提升電池發電功率。因此在本研究中，我們嘗試在 BMB 陽極加入市售硝化菌，同時在陰極區加入市售厭氧菌，希望能雙管齊下讓 BMB 發電能力有所提升，並更進一步協助電池內部的物質循環與平衡。且前一年度的研究中，由於電池的發電能力尚不足，無法測得電池的電流。在本研究中，除小球藻與共生菌外，加入硝化菌和厭氧菌所構成的微型生態圈(BMB)電池發電能力提升，可測得電壓與電流，並進一步計算得到電池的功率密度，更完整表示電池的發電性能。

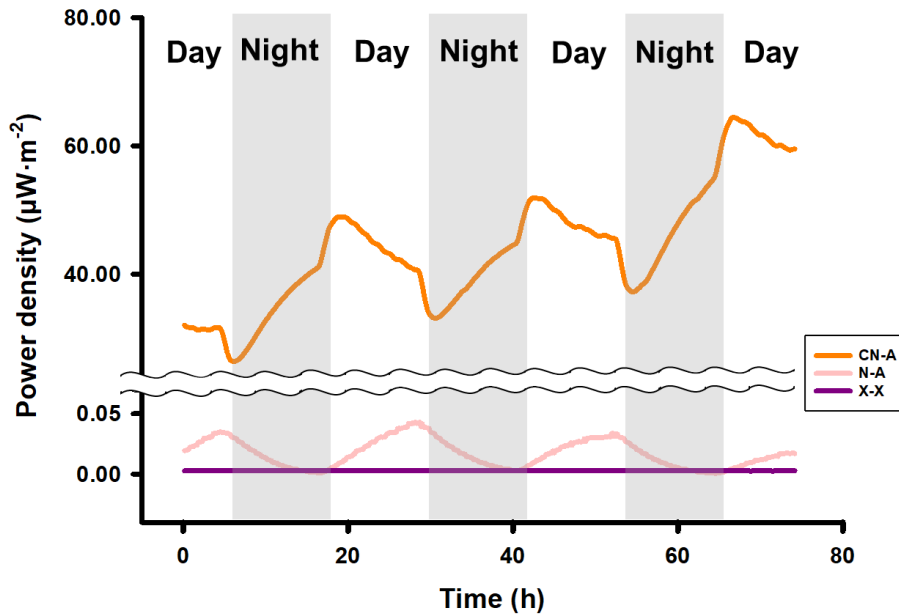
功率密度計算方式如下：

$$\text{電壓 (V)} \times \text{電流 (A)}$$

$$\text{電池表面積 (m}^2\text{)}$$

一、小球藻、硝化菌和厭氧菌對 BMB 發電功率的影響

為了確認在陽極加入硝化菌、陰極加入厭氧菌對 BMB 發電功率的影響，並確認小球藻在此 BMB 中是否能產電，我們首先建立一個陰陽兩極皆無接種微生物的控制組，並將其命名為 X-X。N-A 則是在陽極加入硝化菌，陰極加入厭氧菌的實驗組，CN-A 是陽極有小球藻和硝化菌，陰極有厭氧菌的實驗組。小球藻濃度為 1×10^7 cells/ml，硝化菌和厭氧菌接種菌量皆為 0.5ml OD₆₀₀=1 的菌液。光週期為 12 小時光照 12 小時黑暗。實驗結果如下圖(圖十一)。

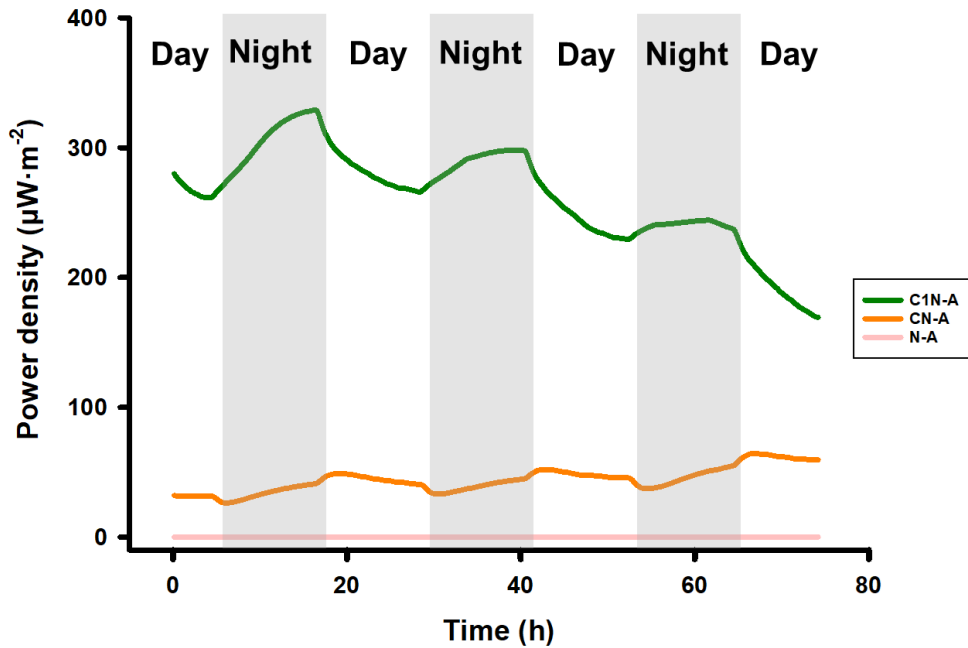


圖十一、BMB 之功率密度紀錄。X-X:陰陽兩極皆沒有接種小球藻和細菌。
N-A:陽極有硝化菌，陰極有厭氧菌。CN-A:陽極有小球藻和硝化菌，陰極有厭氧菌。
白底部分為光照時間，灰底部分為黑暗時間。

1. 當陽極有硝化菌、陰極有厭氧菌時，小球藻能在此種 BMB 中產電，CN-A 平均功率密度為 $44.08 \pm 9.43 (\mu W \cdot m^{-2})$ 且 CN-A 功率密度隨光照週期成規律波動，功率趨勢大致為夜晚上升、白天下降。
2. 控制組 X-X 功率密度幾乎為零，N-A 的平均功率密度 $0.017 \pm 0.011 (\mu W \cdot m^{-2})$ 高於 X-X 的平均功率密度 $0.0028 \pm 0.00099 (\mu W \cdot m^{-2})$ ，顯示陽極加入硝化菌、陰極加入厭氧菌能使 BMB 產電。

二、小球藻共生菌 Sym1 對 BMB 發電功率的影響

為了瞭解小球藻共生菌 Sym1 對 BMB 裝置功率的影響，比照實驗一，設計陽極有硝化菌，陰極有厭氧菌的 N-A 以及陽極有小球藻和硝化菌，陰極有厭氧菌的 CN-A。在本實驗中我們加入 Sym1 構成陽極有小球藻、Sym1、硝化菌，陰極有厭氧菌的組別 C1N-A。小球藻濃度為 1×10^7 cells/ml，共生菌 Sym1、硝化菌、厭氧菌接種菌量皆為 0.5ml OD₆₀₀=1 的菌液。光週期為 12 小時光照 12 小時黑暗。實驗結果如下圖(圖十二)。

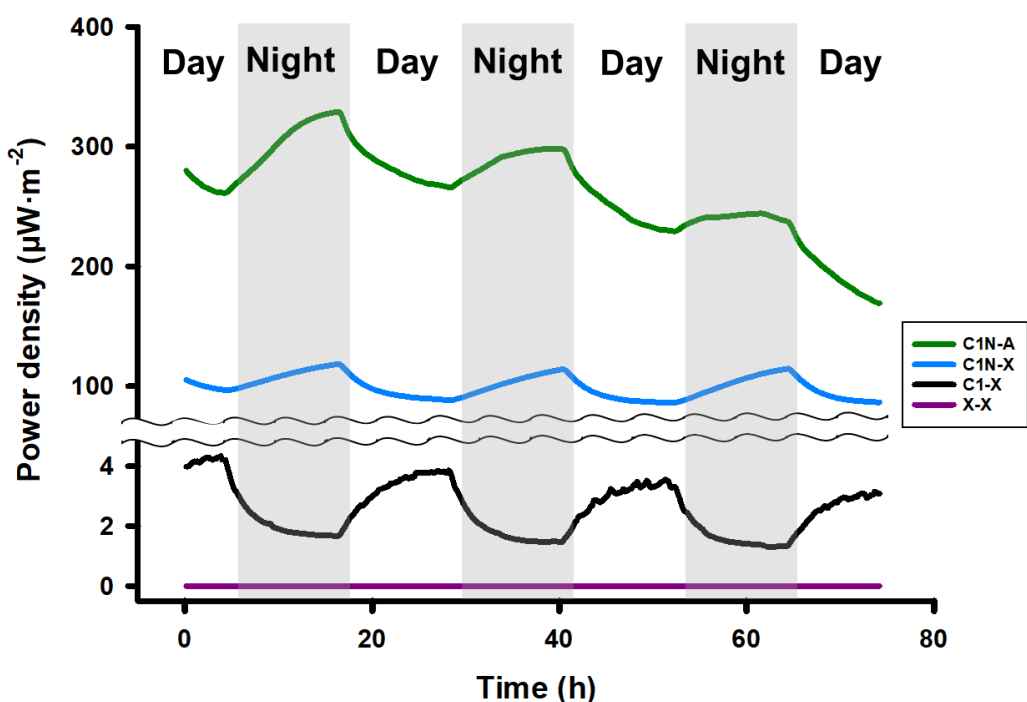


圖十二、BMB 之功率密度紀錄。N-A: 陽極有硝化菌，陰極有厭氧菌。CN-A:陽極有小球藻和硝化菌，陰極有厭氧菌。C1N-A:陽極有小球藻、共生菌 Sym1、硝化菌、陰極有厭氧菌。白底部分為光照時間，灰底部分為黑暗時間。

1. 在 BMB 陽極加入共生菌 Sym1 後組成的 C1N-A，電池功率密度顯著提升，C1N-A 的平均功率密度為 $262.51 \pm 37.30 (\mu W \cdot m^{-2})$ ，高出 CN-A 的 $44.08 \pm 9.43 (\mu W \cdot m^{-2})$ 約五倍之多。
2. C1N-A 功率密度隨光照週期成規律變化，趨勢大致為夜晚上升，白天下降。

三、陽極中硝化菌與陰極中厭氧菌對小球藻共生菌 BMB 功率的影響。

由實驗一知道硝化菌和厭氧菌可以幫助 BMB 發電，由實驗二發現當 BMB 中有硝化菌和厭氧菌時，小球藻和共生菌 Sym1 的組合可以顯著提升電池功率。為了瞭解在小球藻和 Sym1 共存的狀態下，硝化菌和厭氧菌對電池發電功率的影響，我們以 X-X 為對照組，實驗組分別為 C1-X、C1N-X、C1N-A。C1-X 是陽極有小球藻和 Sym1，陽極再加入硝化菌構成 C1N-X，陰極再加入厭氧菌構成 C1N-A。小球藻濃度皆為 1×10^7 cells/ml，共生菌 Sym1、硝化菌、厭氧菌的接種菌量皆為 0.5ml OD₆₀₀=1 的菌液。光週期為 12 小時光照 12 小時黑暗。實驗結果如下圖(圖十三)。



圖十三、BMB 之功率密度紀錄。X-X:陰陽兩極皆沒有接種小球藻和細菌。C1-X:陽極有小球藻和 Sym1, 陰極無菌。C1N-X:陽極有小球藻、Sym1、硝化菌, 陰極無菌。C1N-A:陽極有小球藻、Sym1、硝化菌, 陰極有厭氧菌。白底部分為光照時間, 灰底部分為黑暗時間。

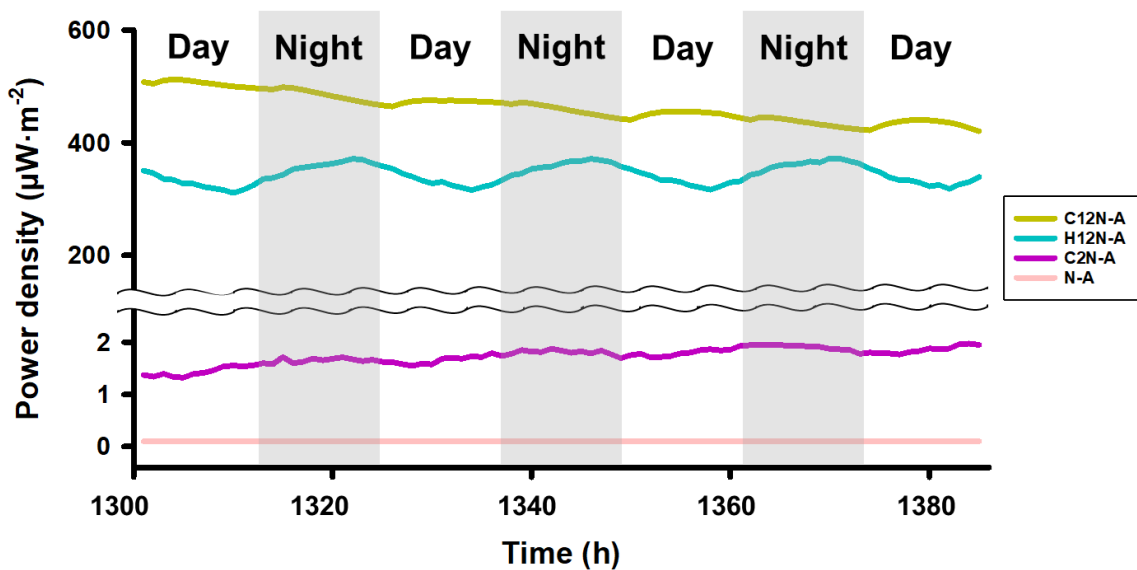
1. 和 C1-X 相比, 陽極再加入硝化菌的 C1N-X 平均功率密度提升至 $99.46 \pm 9.31 (\mu W \cdot m^{-2})$, 平均功率密度約提高 38 倍。且 C1N-X 功率隨光照週期規律變化, 趨勢大致為夜晚上升, 白天下降。
2. 和 C1N-X 相比, 陰極再加入厭氧菌的 C1N-A 平均功率密度提升至 $262.51 \pm 37.30 (\mu W \cdot m^{-2})$, 平均功率密度約提高 16.39%。且 C1N-A 功率隨光照週期規律波動, 趨勢大致為夜晚上升, 白天下降。
3. C1-X 的平均功率密度 $2.51 \pm 0.87 (\mu W \cdot m^{-2})$ 略高於控制組 X-X 的 $0.0028 \pm 0.00099 (\mu W \cdot m^{-2})$, 且隨光照週期成規律變化, 功率趨勢大致為白天上升, 晚上下降。
4. 截至目前為止此批電池已運轉超過 4272 小時, C1N-A 發電功率仍可維持在 $176.98 (\mu W \cdot m^{-2})$ 。
5. 我們推測 C1N-A 電池功率下降的原因可能是電池密封不完全, 發現在長期運作下的電池, 原本填滿 Agar 的地方部分出現凹下的空洞, 也許是藻類光合作用裂解水水分

蒸發所致。水分的散失可能破壞了微型生態圈中的平衡，未來若能將電池密封效果提升，或許能更延長 BMB 的壽命與效能。

6. 在陽極加入硝化菌且在陰極加入厭氧菌確實可以提高 BMB 的發電功率，推測與硝化作用及厭氧代謝相關。在電池長期運作下，伴隨著上層陽極區藻類的老化與死亡將產生許多含氮與含硫化合物，BMB 陽極的硝化細菌與陰極的厭氧菌在幫助藻類代謝廢物的同時，也能分別作為電子流動的推力與拉力，能協助維持微型生態圈中的平衡，也近一步提升電池發電功率。

四、共生菌 Sym1、Sym2 對小球藻及溫泉藻 BMB 的長期影響

在實驗三中，我們確認在陽極加入硝化菌、陰極加入厭氧菌可以顯著提升 BMB 的發電功率，因此接下來的 BMB 組別都將以硝化菌和厭氧菌作為基礎，設計後續的實驗。另外，為了測試 BMB 發電的壽命與穩定性，我們在電池運轉 1300 小時後，偵測其功率密度。以 N-A 為對照，實驗組有 C2N-A、C12N-A、H12N-A。以 N-A 為基礎，陽極加入小球藻和共生菌 Sym2 構成 C2N-A，再加入 Sym1 構成 C12N-A。另外，由於我們希望之後能將電池放在真實太陽光底下實測，但發電過程中電池內部溫度升高，將有可能導致小球藻不耐高溫而死，因此在本年度的研究中，我們引入火山口旁所採集的溫泉藻(Hot spring algae, H)，搭上小球藻共生菌 Sym1、Sym2，構成 H12N-A，先在實驗室中進行功率測試。小球藻與溫泉藻濃度為 1×10^7 cells/ml，小球藻共生菌 Sym1 與 Sym2、硝化菌、厭氧菌接種菌量皆為 0.5ml OD₆₀₀=1 的菌液。實驗光週期為 12 小時光照 12 小時黑暗。實驗結果如下圖(圖十四)。



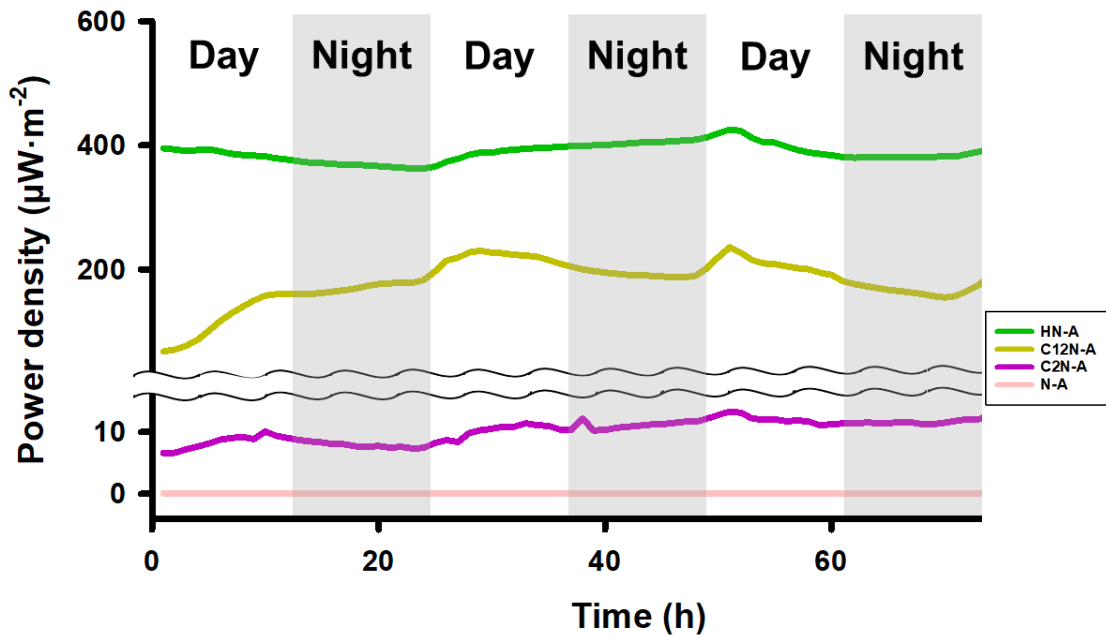
圖十四、BMB 之功率密度紀錄。N-A:陽極有硝化菌，陰極有厭氧菌。C2N-A:陽極有小球藻、共生菌 Sym2、硝化菌，陰極有厭氧菌。C12N-A:陽極有小球藻、共生菌 Sym1 與 Sym2、硝化菌，陰極有厭氧菌。H12N-A: 陽極有溫泉藻、小球藻共生菌 Sym1 與 Sym2、硝化菌，陰極有厭氧菌。白底部分為光照時間，灰底部分為黑暗時間。

1. 電池運轉超過 1300 小時後，三個實驗組 BMB (C2N-A、C12N-A、H12N-A) 依然能夠日夜穩定發電。C2N-A 平均功率密度 $1.73 \pm 0.16 (\mu W \cdot m^{-2})$ ，C12N-A 平均功率密度 $463.19 \pm 25.50 (\mu W \cdot m^{-2})$ ，H12N-A 平均功率密度 $343.20 \pm 17.51 (\mu W \cdot m^{-2})$ 。
2. 若將 Sym1 與 Sym2 同時加入陽極(C12N-A)，功率密度可提高至 $463.19 \pm 25.50 (\mu W \cdot m^{-2})$ ，且夜間功率可達白天的 93.1%，
3. 與 C2N-A 相比，陽極加入 Sym1 後的 C12N-A 功率顯著提升超過 266 倍。
4. H12N-A 的功率略低於 C12N-A 的功率。且兩者功率隨光照週期規律波動，H12N-A 功率趨勢大致為夜晚上升，白天下降；C12N-A 功率趨勢大致為白天上升，夜晚下降。

五、小球藻與溫泉藻 BMB 在野外環境下的發電功率

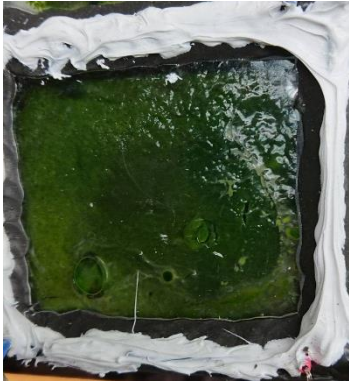
為了瞭解 BMB 實際使用的成效，我們將電池放置於太陽光底下進行功率密度實測。同樣以 N-A 為對照，實驗組有 C2N-A、C12N-A、HN-A。以 N-A 為基礎，陽極加入小球藻和共生菌 Sym2 構成 C2N-A，再加入 Sym1 構成 C12N-A，由於我們推測溫泉藻可能較耐高溫可在太陽光熱底下運作，因此設計含有溫泉藻的 HN-A。小球藻及溫泉藻濃度皆為 1×10^7 cells/ml，小球藻共生菌 Sym1 與 Sym2、硝化菌、厭氧菌接種菌量皆為 0.5ml OD₆₀₀=1

的菌液。光照週期為 12 小時光照 12 小時黑暗，實驗結果如下圖(圖十五)。

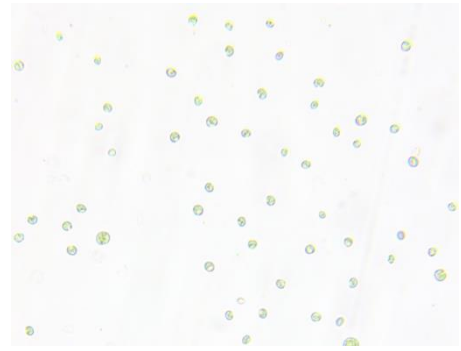


圖十五、BMB 之功率密度紀錄。N-A:陽極有硝化菌，陰極有厭氧菌。C2N-A:陽極有小球藻、共生菌 Sym2、硝化菌，陰極有厭氧菌。C12N-A:陽極有小球藻、共生菌 Sym1 與 Sym2、硝化菌，陰極有厭氧菌。HN-A: 陽極有溫泉藻、硝化菌，陰極有厭氧菌。白底部分為光照時間，灰底部分為黑暗時間。

1. 在太陽底下實測，BMB 仍然能夠日夜穩定發電。C2N-A 平均功率密度為 $10.15\pm 1.74 (\mu\text{W}\cdot\text{m}^{-2})$ ，C12N-A 平均功率密度為 $179.92\pm 37.55 (\mu\text{W}\cdot\text{m}^{-2})$ ，HN-A 平均功率密度為 $388.80\pm 14.87 (\mu\text{W}\cdot\text{m}^{-2})$ 。
2. 在太陽底下實測，含有溫泉藻的 BMB (HN-A) 可達到更高的功率密度 $388.80\pm 14.87 (\mu\text{W}\cdot\text{m}^{-2})$ ，比起含小球藻和共生菌(Sym1, Sym2) 的 C12N-A 高出約 116%。而且即使在夜間，HN-A 仍然能夠維持白天功率的 97.9%。
3. 即使在夜間，C12N-A 仍然能夠維持白天功率的 90.8%。



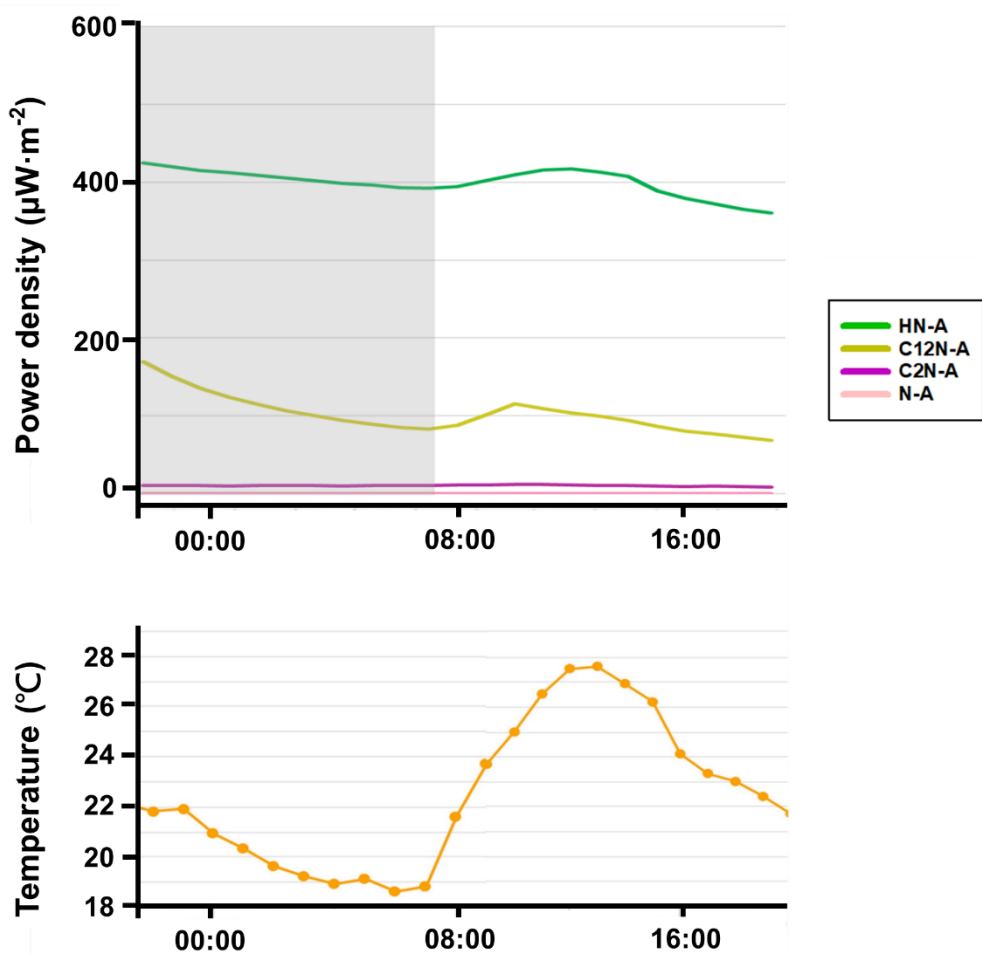
圖十六、溫泉藻在 BMB 中的生長狀況

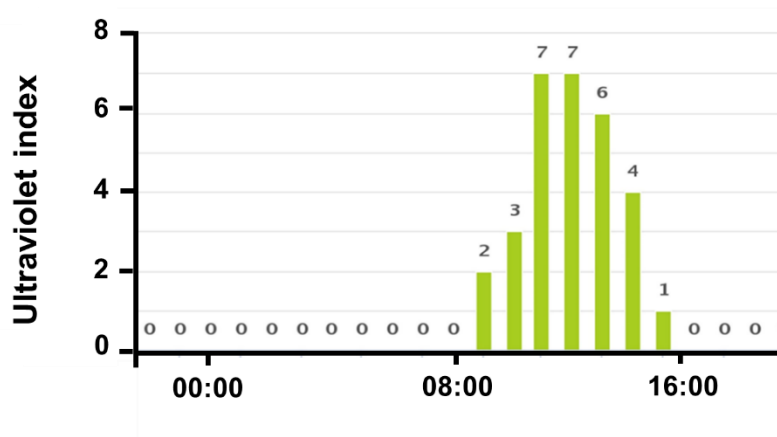


圖十七、溫泉藻顯微鏡照片

六、太陽光下實測 BMB 發電功率與溫度及紫外線關係

由實驗五中發現在太陽光底下測試含有溫泉藻的 BMB 發電功率較高，電池性能較好。為了探究其中的原因，我們上網查詢中央氣象局的溫度及紫外線資料(2/25 21:58~2/26 19:16)並對照當時 BMB 發電功率圖。





圖十八、太陽光下實測 BMB 發電功率密度對照當天溫度及紫外線圖。

N-A:陽極有硝化菌，陰極有厭氧菌。C2N-A:陽極有小球藻、共生菌 Sym2、硝化菌，陰極有厭氧菌。C12N-A:陽極有小球藻、共生菌 Sym1 與 Sym2、硝化菌，陰極有厭氧菌。HN-A: 陽極有溫泉藻、硝化菌，陰極有厭氧菌。白底部分為光照時間，灰底部分為黑暗時間。橘色折線圖為溫度變化圖，綠色柱狀圖為紫外線指數變化圖。(測試時間:2/25 21:58~2/26 19:16)

1. 包含溫泉藻的 HN-A 發電效果佳，較能忍受太陽光熱底下的高溫，未來有較高的應用價值。
2. BMB 能夠在太陽光照射下持續發電，但含有小球藻的 BMB (C12-A) 功率明顯下降。
3. 我們觀察到在太陽光底下實測時，大約一週後小球藻所構成的 BMB 顏色開始轉黃，功率也隨之下降，推測可能是因為小球藻無法承受高溫以及每日太陽照射下溫度的劇烈變化所致。

肆、結論與應用

一、結論

(一)

陽極加入硝化菌且陰極加入厭氧菌能大幅提升小球藻共生菌 BMB 的功率並延長電池壽命。陽極加入硝化菌後平均功率密度提升至 $99.46 \pm 9.31 (\mu W \cdot m^{-2})$ 約提高 38 倍，陰極再加入厭氧菌後平均功率密度再提升至 $262.51 \pm 37.30 (\mu W \cdot m^{-2})$ 約提高 16.39%。組別 C1N-A 截至目前為止已運轉超過 4272 小時，發電功率仍保有 67.4% ($176.98 \mu W \cdot m^{-2}$)。

(二)

同時加入小球藻共生菌 Sym1 與 Sym2 可顯著提升小球藻 BMB 功率。C12N-A 功率密度可達 $463.19 \pm 25.50 (\mu W \cdot m^{-2})$ ，且夜間功率可達白天的 93.1%，與只有共生菌只加入 Sym2 的 C2N-A 相比，陽極加入 Sym1 後的 C12N-A 功率顯著提升超過 266 倍。

(三)

在太陽底下實測，含有溫泉藻的 BMB (HN-A) 可達到更高的功率密度 $388.80 \pm 14.87 (\mu W \cdot m^{-2})$ ，比起含小球藻和共生菌(Sym1, Sym2) 的 C12N-A 高出約 116%。而且即使在夜間，HN-A 仍然能夠維持白天功率的 97.9%，發電量較高且穩定。

(四)

我們設計建構出由小球藻、共生菌與硝化菌、厭氧還原菌三類微生物為主體之微型生態圈(BMB)，能將太陽能轉換為電能的產出，日夜穩定發電，並進行長期運行與野外電池實測，提高此微型生態圈發電裝置的應用性。

二、進行中研究

篩選溫泉藻中的共生菌，由於溫泉藻需在酸性環境下培養，Agar 不易凝固，初步篩選溫泉藻的共生菌有遇到困難，未來期能嘗試其他方法進行篩選，再將溫泉藻的共生菌加入 BMB 中進行野外太陽光底下的功率實測，提高溫泉藻 BMB 的應用價值。

三、應用

由本研究結果可得知，此種微型生態圈(BMB)能將太陽能轉換為電能的產出且日夜穩定發電並長期運行，亦可實際應用在野外太陽光照底下，有機會解決矽晶光電板生產過程的環保問題，穩定度高、夜間能發電、不需添加額外培養基、功率提升為此種微型生態圈的四大優勢。未來有望能以此建構一套不須儲電系統且不需要添加額外培養基的生物太陽能發電裝置。

伍、參考文獻

葉奕廷(2019)。利用藻類沉積物中的共生體採收擬球藻。天主教輔仁大學生命科學研究所碩士論文，新北市。

蔡語(2019)。利用共生菌提升生物光伏電池產電效率。天主教輔仁大學生命科學研究所碩士論文，新北市。

Albina P., Durban N., Bertron A., Albrecht A., Robinet J. and Erable B. (2019) **Influence of Hydrogen Electron Donor, Alkaline pH, and High Nitrate Concentrations on Microbial Denitrification: A Review.** *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 5163.

Barbaro S., Cannata G., Coppolino S. and Sinagra L. C. E. (1981) **Correlation between relative sunshine and state of the sky.** *Solar Energy.*,26, 537–550.

Bombelli P., Bradley R.W., Scott A.M., Philips A. J., McCormick A. J., Cruz S.M., Anderson A., Yunus K., Bendall D.S., Cameron P. J., Davies J.M., Smith A.G. , Howe C. J. and Fisher A.C. (2011) **Quantitative analysis of the factors limiting solar power transduction by *Synechocystis sp. PCC 6803* in biological photovoltaic devices.** *Energy Environ. Sci.*,4 , 4690.

Bradley R. W., Bombelli P., Rowden S. J. and Howe C. J. (2012) **Biological photovoltaics: intra-**

and extra-cellular electron transport by cyanobacteria. *Biochem Soc Trans.*, 40(6), 1302-1307

Carrillo A.J, González A. J., Romero M. and Coronado J.M. (2019) **Solar Energy on Demand: A Review on High Temperature Thermochemical Heat Storage Systems and Materials.** *Chem Rev.*, 119 (7), 4777-4816.

Cooper M. B., Kazamia E., Helliwell K. E., Kudahl U. J., Sayer A., Wheeler G. L. and Smith A. G. (2019) **Cross-exchange of B-vitamins underpins a mutualistic interaction between *Ostreococcus tauri* and *Dinoroseobacter shibae*.** *ISME J.*, 13(2), 334-345.

Croft M.T., Lawrence A.D., Raux-Deery E., Warren M.J. and Smith A.G. (2005) **Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria.** *Nature*, 438, 90–93.

Duțeanu N. M., G M. M., Erable B. and Scott K. (2010) **Microbial fuel cells – An option for wastewater treatment.** *Environ. Eng. Manag. J.*, 9 (8). 1069-1087.

Gevertz D., Telang A. J., Voordouw G. and Jenneman G.E. (2000) **Isolation and characterization of strains CVO and FWKO B, two novel nitrate-reducing, sulfide-oxidizing bacteria isolated from oil field brine.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(6), 2491-501.

Gorby Y.A., Yanina S., McLean J. S., Rosso K. M., Moyles D., Dohnalkova A., Beveridge T. J., Chang I. S., Kim B. H., Kim K. S., Culley D. E., Reed S. B., Romine M. F., Saffarini D. A., Hill E. A., Shi L., Elias D. A., Kennedy D. W., Pinchuk G., Watanabe K., Ishii S., Logan B., Nealson K. H. and Fredrickson J. K. (2006) **Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms.** *PNAS*, 103 (30), 11358-11363.

- Jenny T., Bin L., and Jens O. K. (2019) **Biophotovoltaics: Green Power Generation From Sunlight and Water.** *Front. Microbiol.*, 10, 866.
- Kadi L. S., Bombelli P., Lea-Smith D. J., Call T., Aro E. M., Müller T., Howe C. J. and Knowles T.P.J. (2018) **Enhancing power density of biophotovoltaics by decoupling storage and power delivery.** *Nature, Energy*, 3, 75–81.
- Marsili E., Baron D. B., Shikhare I. D., Coursolle D., Gralnick J. A. and Bond D. R. (2008) ***Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105, 3968–3973.
- McCormick A. J., Bombelli P., Bradley R. W., Thorne R., Wenzel T. and Howe C. J. (2015) **Biophotovoltaics: oxygenic photosynthetic organisms in the world of bioelectrochemical systems.** *Energy Environ. Sci.*, 8, 1092-1109.
- Men Y., Achermann S., Helbling D. E., Johnson D. R. and Fenner K. (2016) **Relative contribution of ammonia oxidizing bacteria and other members of nitrifying activated sludge communities to micro pollutant biotransformation.** *Water Res.*, 109, 217-226.
- Newman D. K. (2006) **Bacteria Are Beautiful.** *Engineering & Science.*, 2, 12.
- Ng F. L., Phang S. M., Periasamy V., Yunus K. and Fisher A. C. (2017) **Enhancement of Power Output by using Alginate Immobilized Algae in Biophotovoltaic Devices.** *Scientific Reports.*, 7, 16237.
- Ortiz-Marquez J. C., Do Nascimento M., Dublan Mde L. and Curatti L. (2012) **Association with an ammonium-excreting bacterium allows diazotrophic culture of oil-rich**

eukaryotic microalgae. *Appl Environ Microbiol.*,78, 2345–2352.

Rabaey K., Boon N., Hofte M., and Verstraete W. (2005) **Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells.** *Environ. Sci. Technol.*,39, 3401–3408.

Rivas M.O., Vargas P. and Riquelme C. E. (2010) **Interactions of Botryococcus braunii cultures with bacterial biofilms.** *Microb Ecol.*,60, 628–635.

Sawa M., Fantuzzi A., Bombelli P., Howe C. J., Hellgardt K. and Nixon P. J. (2017). **Electricity generation from digitally printed cyanobacteria.** *Nat. Commun.*,8, 1327.

Sun J., Zhang Q., Ding R., Lv H., Yan H., Yuan X. and Xu Y. (2014) **Contamination-resistant silica antireflective coating with closed ordered mesopores.** *Phys Chem Chem Phys.*,16(31):16684-16693.

Tanaka K., Tamamushi R. and Ogawa T. (1985) **Bioelectrochemical fuel-cells operated by the cyanobacterium, *Anabaena variabilis*.** *J. Chem. Technol. Biotechnol. Ser. B Biotechnol.*,35, 191–197.

Tanaka K., Kashiwagi N. and Ogawa T. (1988) **Effects of light on the electrical output of bioelectrochemical fuel-cells containing *Anabaena variabilis* M-2: mechanism of the post-illumination burst.** *J. Chem. Technol. Biotechnol.*,42, 235–240.

Vijayakumar M., Adduru J., Rao T.N. and Karthik M. (2018) **Conversion of Solar Energy into Electrical Energy Storage: Supercapacitor as an Ultrafast Energy-Storage Device Made from Biodegradable Agar-Agar as a Novel and Low-Cost Carbon Precursor.** *Glob Chall.*, 2(10), 1800037.

Wenzel T., Härtter D., Bombelli P., Howe C. J., and Steiner U. (2018) **Porous translucent electrodes enhance current generation from photosynthetic biofilms.** *Nat. Commun.*, 9, 1299.

Winogradsky, S. (1891) **Sur les organismes de la nitrification.** *Ann. Inst. Pasteur* 5, 92–100, 577–616.

Xiang Y., Liu G., Zhang R., Lu Y. and Luo H. (2017) **Acetate production and electron utilization facilitated by sulfate-reducing bacteria in a microbial electrosynthesis system.** *Bioresour Technol.*, 241, 821-829.

Yagishita T., Horigome T. and Tanaka K. (1993). **Effects of light, CO₂ and inhibitors on the current output of biofuel cells containing the photosynthetic organism *Synechococcus* sp.** *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 56, 393–399.

Zarezadeh S., Moheimani N. R., Jenkins S. N., Hülsen T., Riahi H. and Mickan B.S. (2019) **Microalgae and Phototrophic Purple Bacteria for Nutrient Recovery From Agri-Industrial Effluents: Influences on Plant Growth, Rhizosphere Bacteria, and Putative Carbon- and Nitrogen-Cycling Genes.** *Front Plant Sci.*, 10, 1193.

Zhang J. Z., Bombelli P., Sokol K. P., Fantuzzi A., Rutherford A. W. and Howe C. J. (2018). **Photoelectrochemistry of photosystem II in vitro vs in vivo.** *J. Am. Chem. Soc.*, 140, 6–9.

Zhao J., Wu J., Li X., Wang S., Hu B. and Ding X. (2017) **The Denitrification Characteristics and Microbial Community in the Cathode of an MFC with Aerobic Denitrification at High Temperatures.** *Front. Microbiol.*, 8, 9.

Zhu H., Meng H., Zhang W., Gao H., Zhou J., Zhang Y. and Li Y. (2019) **Development of a longevous two-species biophotovoltaics with constrained electron flow.** *Nat. Commun.*, 10, 4282.

【評語】 070003

1. 本文延續去年研究，利用生物進行太陽能光電轉換的發電裝置製作生物光伏電池，並找出最佳化生物光伏電池的條件，在陽極加入硝化菌，陰極加入厭氧菌能大幅提升小球藻共生菌 BMB 的發電功率，並延長電池壽命。研究獲得不錯的具體成果，是件很好的科展作品。唯實驗設計時若能多增加一些對照組，結論能更具說服力。溫泉菌為何種溫泉菌應進一步鑑定，其野外試驗結果比小球藻效能更好更穩定，應著重於此溫泉菌進一步研究。
2. 本研究有應用潛力，目前雖已有初步結果，但離實際應用仍有一段距離。
3. 共生菌及溫泉菌應於鑑定之另電池運作期間，藻類及菌種的數量變化宜加以定量分析。
4. 與蔡語 2019 的碩士論文之區別為何。
5. 實驗設計周詳，數據結果明確。
6. 所用各種藻類、共生菌及其他微生物取材自本地，效果佳。
7. 本實驗具有創意，但共生菌於生物光伏電池的應用似已有報告。