

中華民國第 54 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高中組 生活與應用科學科

040804

牛糞產氫

學校名稱：國立羅東高級中學

作者： 高二 曾 欣 高二 吳書帆 高二 黃士軒	指導老師： 李建勳 林兆駿
---	-----------------------------

關鍵詞：芽孢桿菌、生質能、氫燃料電池

摘要

芽孢桿菌是一種厭氧桿菌，本研究取出牛糞裡的芽孢桿菌，並在厭氧的環境下由其發酵產生氫。在實驗過程中探討 pH 值及溫度變化的最佳條件，以提高產氫的效率。所產生的氫氣則透過質子交換膜製做成電池，使其發電並測量電功率，使我們的燃料電池經濟又環保。

壹、研究動機

取出牛糞，利用其中的芽孢桿菌，在厭氧的條件下，進行產氫，產生新的能源。我們開始透過實驗探討是否有其可行性，而後推測牛糞裡可產氫的菌種可以成為能量形式的來源。所以在本研究中就對於牛糞產氫的實驗做變因控制及探討，期望透過實驗來了解牛糞是否可以轉化為有效的能量。

產生的氫氣透過質子交換膜產生一組高效能的燃料電池，以達到環保的目的。

貳、研究目的

- 一、菌種培養，確認實驗過程中菌的種類，並收集相關資料
- 二、實驗在不同 pH 值下，芽孢桿菌產氫的效率，並找出最佳的 pH 範圍
- 三、分析芽孢桿菌產生氣體的主要成分
- 四、紀錄不同時間下芽孢桿菌的產生 CO₂ 的速率，並設計實驗去除 CO₂
- 五、以產生的 H₂ 連接氫燃料電池並測量電池的功率

參、研究設備及器材

一、菌種培養：

器具名稱	器具名稱
容量瓶 (2000ML)	電子秤
燒杯 (50、100、250、400、1000ML)	濾紙
培養皿	滴管
試管	剪刀
量筒 (15、25ML)	解剖刀
載玻片	恆溫箱
玻片	玻棒
碘液 (市售, 染色用)	夾子
滅菌操作台	PARAFILM
顯微鏡	PIPETTE
酒精 (操作滅菌台前消毒用)	針筒及針頭 (滴定用)
培養基 (NA)	加熱攪拌器
大腸桿菌	高溫殺菌器 (1.2atm, 120°H ₂ O)
秤量紙	鋁箔紙
漏斗	UV燈
試管架	酒精燈 (消毒玻璃製品)
標籤	烤箱 (160°乾熱消毒玻璃製品)
錐形瓶	酒精燈 (消毒玻璃製品)
酒精 (操作滅菌台前消毒用)	針筒及針頭 (滴定用)
培養基 (NA)	加熱攪拌器
大腸桿菌	高溫殺菌器 (1.2atm, 120°H ₂ O)
秤量紙	鋁箔紙
漏斗	UV燈
試管架	標籤
烤箱 (160°乾熱消毒玻璃製品)	

二、產氫的設備(器材)及藥品：

燒杯	玻棒	溫度計
軟管	pH sensor	夾子
六公升集氣瓶	兩公升血清瓶	加熱儀器
少量牛糞	蒸餾水	蔗糖
胺基酸	酵母萃取	矽油
氫氧化鈉	自製燃料電池	CRDS 分析系統

肆、原理探討

芽孢桿菌屬屬於革蘭氏陽性菌，包括模式生物枯草芽孢桿菌和著名的致病菌炭疽桿菌等。芽孢桿菌（*Bacillus*），細菌的一科，能形成芽孢（內生孢子）的桿菌或球菌。包括芽孢桿菌屬、芽孢乳桿菌屬、梭菌屬、脫硫腸狀菌屬和芽孢八疊球菌屬等。

中文學名：芽孢杆菌屬-嗜熱脂肪土芽孢桿菌

拉丁學名：*Geobacillus stearothermophilus*

界：細菌界

特點：

1. 繁殖快速：代謝快、繁殖快，四小時增殖 10 萬倍，標準菌四小時後可繁殖 6 倍。
2. 生命力強：無濕狀態可耐低溫 -60°C 、耐高溫 $+280^{\circ}\text{C}$ 。
3. *Grobacillus* 屬於 2001 年命名，具有嗜熱、兼性厭氧等特性，可應用在環境治理等領域。



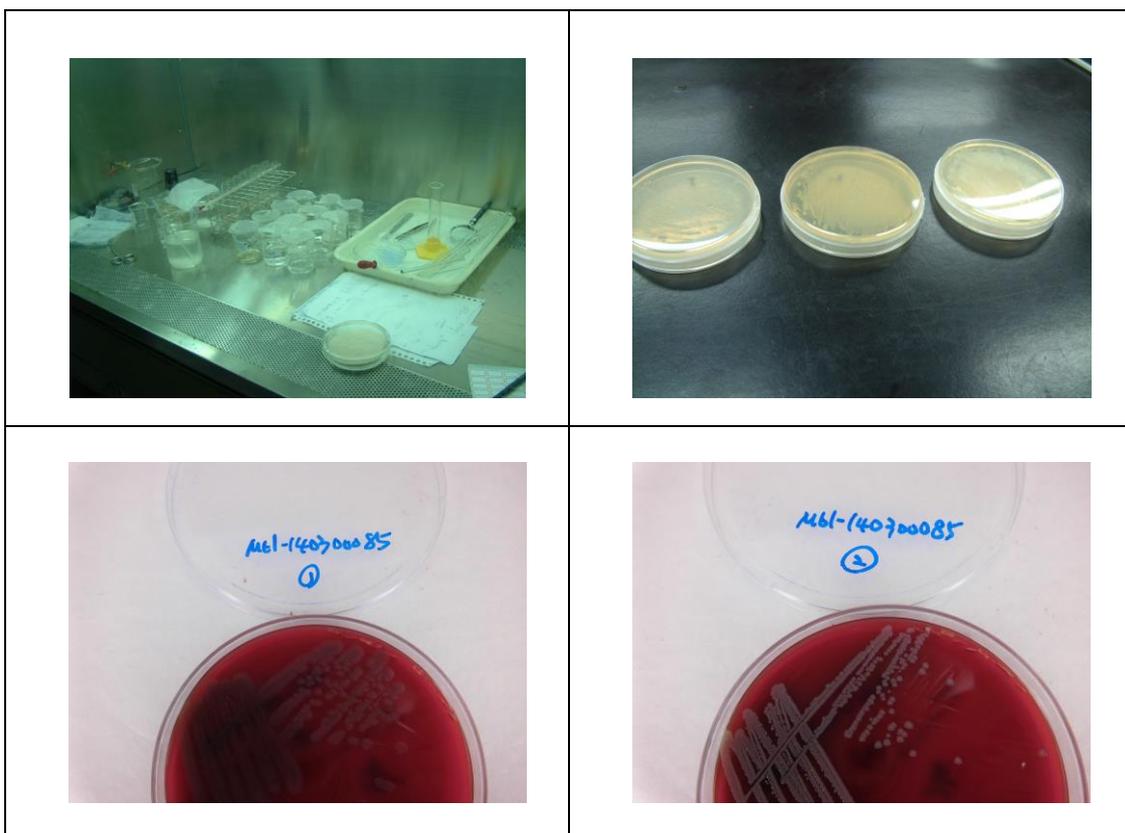
伍、實驗步驟及實驗結果

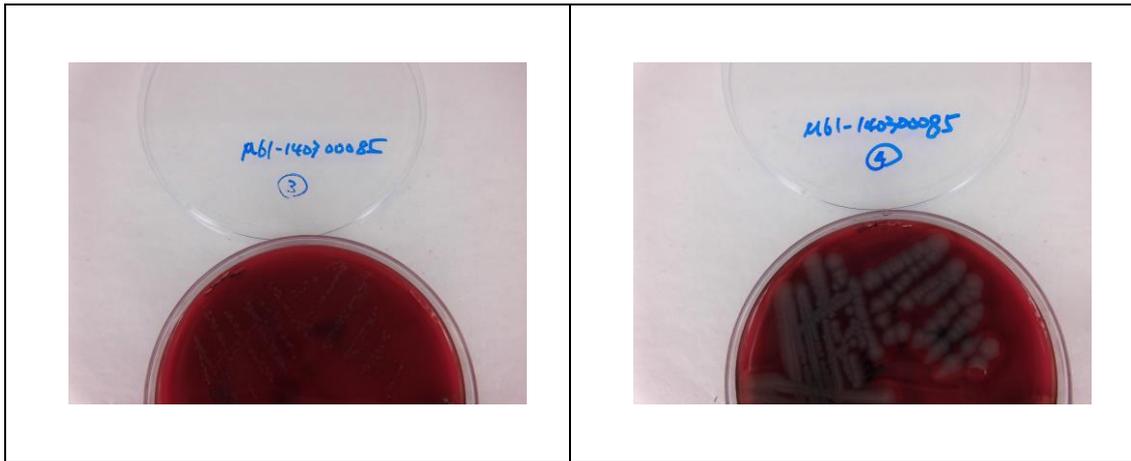
第一部分：牛糞中菌種的培養與確認(註 1)

一、將牛糞置於乾燥的土中，約四天後牛糞中的芽孢桿菌會產生孢子，而其外觀呈現較乾燥狀，即可取出牛糞 100 克，將其與水混合放置於熱水浴中水加熱(85 °C~100°C) 以去除大部分雜菌，並將菌種培養，確認。

二、過程與步驟：

1. 製作培養基並高溫高壓做滅菌。
2. 到紫外燈管下再做表面滅菌完成培養基的製作，並備用。
3. 取處理好的牛糞溶液 0.1 cc滴到培養基上。
4. 用酒精燈燒過的玻棒先降溫，來回塗抹的方式將溶液均勻的塗在培養基上，並算灌入 CO₂ 氣體再蓋上培養皿蓋子。





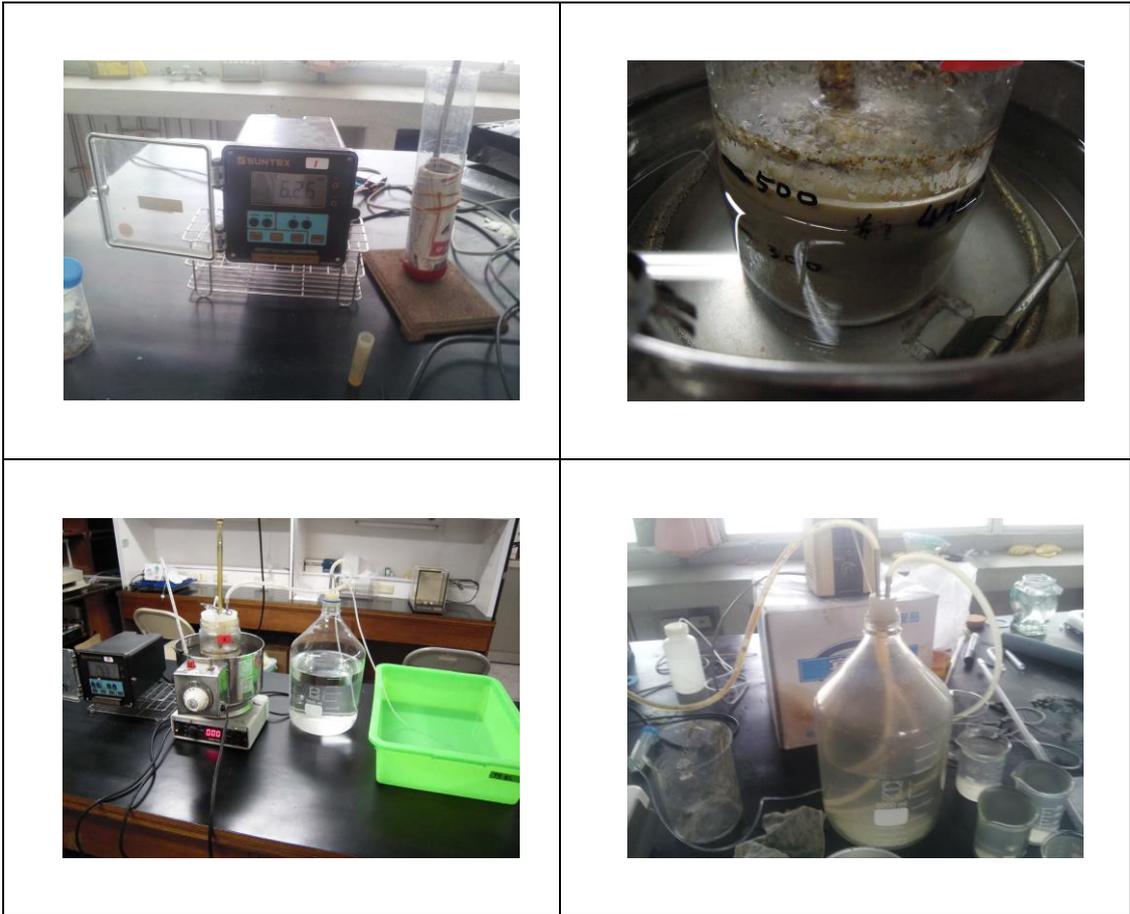
說明：加熱後的牛糞溶液中，最後剩下 4 種菌，均屬於芽孢桿菌屬。

第二部分：實驗在不同 pH 值下，芽孢桿菌產氫的效率，並找出最佳的 pH 範圍

一、牛糞的前置處理及產氫實驗：

1. 取出牛糞 100 克，將其與水混合放置於熱水浴中水加熱(85 °C~100°C) 以去除大部分雜菌，放入發酵槽中，加入培養基(0.3% Beef extract、0.3% Yeast extract、2% Glucose)，上層加入液態石蠟烴(使牛糞與培養基保持在厭氧狀態)。
2. 校正 pH sensor，穿過塞子並封住杯口，留一開口作為取樣，另一開口不可接觸液面並接一條軟管到兩公升血清瓶。夾住取樣管，使容器為密閉，在集氣瓶中加入 NaOH，以吸收二氧化碳及水氣，裝置如下圖所示。





說明：發酵產氫的設備的流程圖：

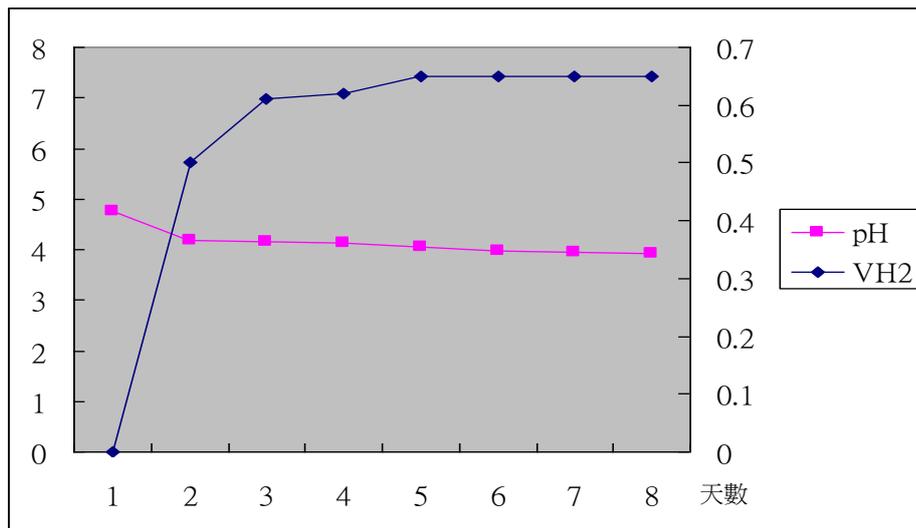
- (1) 用 pH 電極偵測發酵液的酸鹼值變化，水浴槽控制溫度約 30°C，以電磁攪拌器低速攪拌，以不擾亂礦物油和培養液的界面為原則，以排水集氣法收集產生的氣體。
- (2) 重複上述步驟，改以用 0.05N NaOH 溶液收集產生的氣體。

3. 定時觀察與記錄集氣量及 pH 值，及尋找最佳條件：

(1) 第一種實驗控制條件：

未加入 NaOH 調 pH 值，及未加入緩衝溶液，其結果如下：

天數	記錄時間	pH	V _{H₂}
1	1500	4.77	0
2	1505	4.18	0.50
3	1500	4.16	0.61
4	1504	4.12	0.62
5	1505	4.04	0.65
6	1500	3.97	0.65
7	1500	3.95	0.65
8	1500	3.92	0.65



說明：(1) 從實驗組裝好起，每天約下午 3 點做氣體體積及 pH 值觀察與記錄。

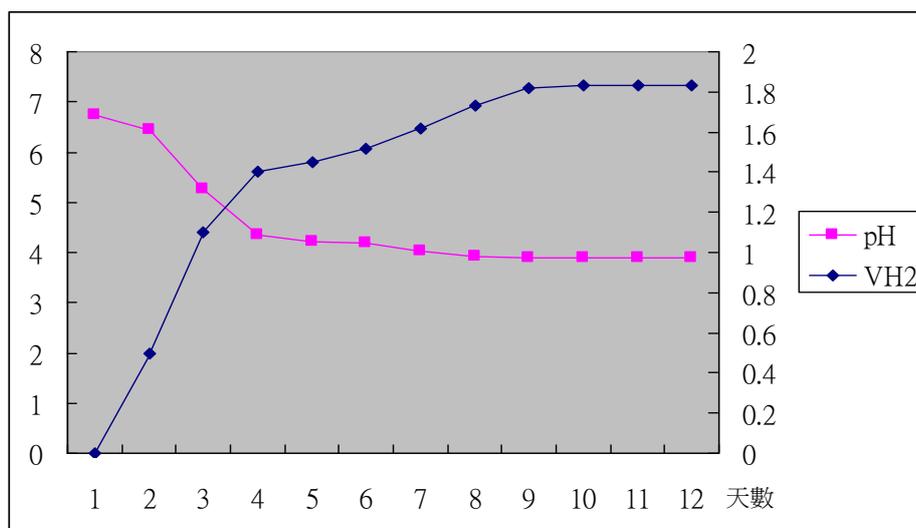
(2) 發酵過程中，由第一天開始 pH 4.77 慢慢下降至 pH 4.0 附近，之後 pH 略降至 pH 3.9 左右，氣體的產生幾乎停止，顯示發酵的過程與 pH 值有關與芽孢桿菌的存活率有關，最後(共 8 天)產生氣體的體積約 0.65 升。

(3) 因第 5 天開始依據產生氣體的體積已經不再增加，所以在第 8 天結束實驗。

(2) 第二種實驗控制條件：

加入 NaOH 調 pH 值接近 7，但未加入緩衝溶液，結果如下：

天數	記錄時間	pH	V _{H₂}
1	1500	6.75	0
2	1505	6.45	0.5
3	1500	5.27	1.1
4	1504	4.35	1.4
5	1505	4.21	1.45
6	1500	4.19	1.52
7	1500	4.02	1.62
8	1500	3.92	1.73
9	1510	3.90	1.82
10	1504	3.90	1.83
11	1500	3.90	1.83
12	1500	3.89	1.83



說明：(1) 發酵過程先以 NaOH 調 pH 值至 6.75，在整個實驗記錄中 pH 值一直下降，pH 5 左右氣體的產生已經開始變的緩慢，由紀錄顯示前 3 天氣體的生成速率最快

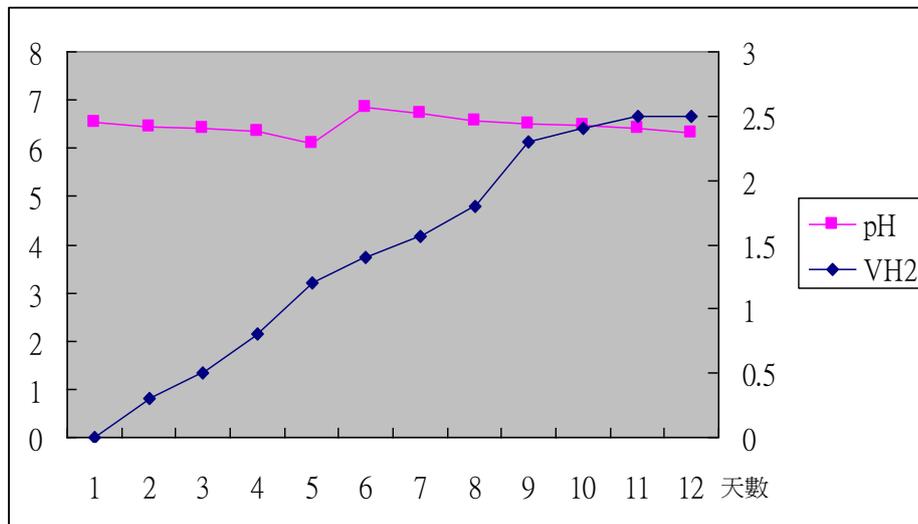
(2) 之後 pH 持續下降，到 pH 3.9 左右，氣體的產生幾乎停止，觀察 12 天後產生氣體的量約 1.8 升。

(3) 由上圖中可看出 pH 約在 6~7 之間氣體的生成速率最快，間接說明在這個條件下最適合芽孢桿菌的生長。

(3) 第三種實驗控制條件：

加入 NaOH 調 pH 值，及加入緩衝溶液(0.5% KH₂PO₄)，結果如下：

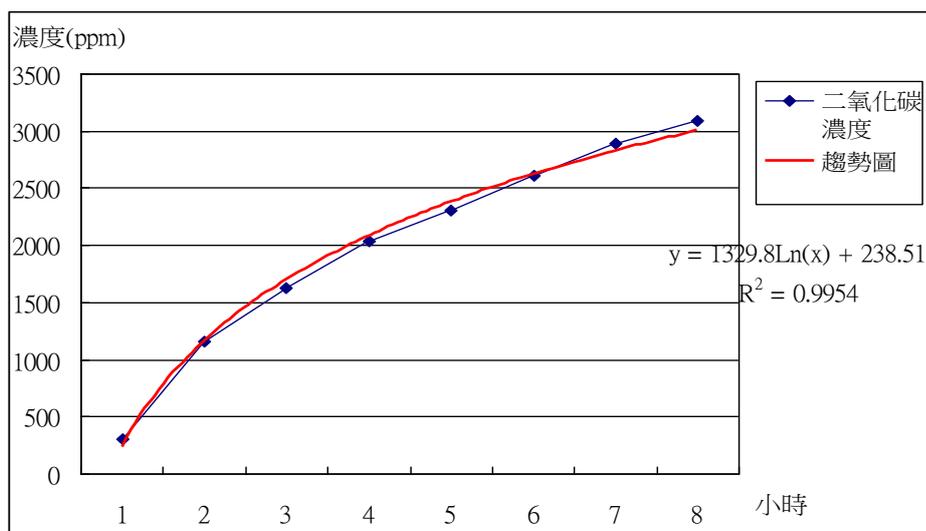
天數	記錄時間	pH	V _{H₂}
1	1500	6.55	0
2	1505	6.45	0.3
3	1500	6.41	0.5
4	1504	6.35	0.8
5	1505	6.11	1.2
6	1500	6.86	1.4
7	1500	6.73	1.57
8	1500	6.58	1.8
9	1510	6.51	2.3
10	1504	6.47	2.4
11	1500	6.41	2.5
12	1500	6.33	2.5



說明：(1) 發酵過程中，溶液的 pH 值控制在 6 到 7 之間，記錄 12 天產生氣體的體積約 2.5 升。

(2) 在記錄的前 9 天中，氣體的生成速率很一致，表示再 pH 6~7 之間，適合芽孢桿菌的生長也是較佳的條件。

二、偵測前 8 小時 CO₂ 的濃度(ppm)，結果如下：



說明：(1) CO₂ 的濃度隨時間(分鐘)的偵測值而上升，表示整個實驗中芽孢桿菌一直在生長與反應。

(2) 因實驗過程中會產生 CO₂，所以在排水集氣時改以用 0.05N NaOH 溶液，用以吸收 CO₂。

第三部分：測定及分析不同條件下生成氣體的組成百分比

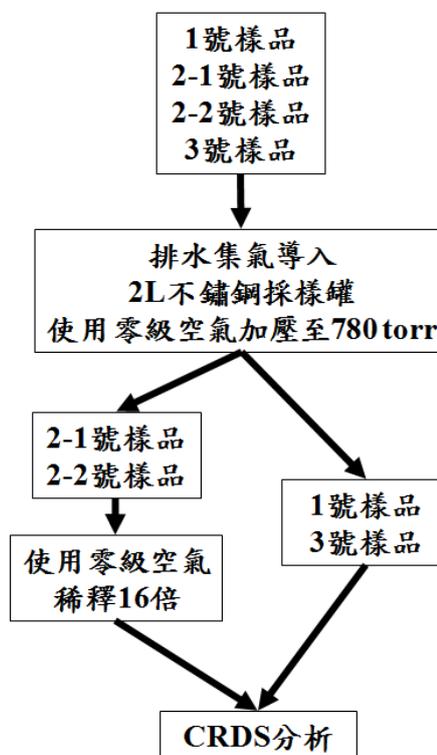
一、氣體的測定：(註 2)

實驗流程圖：

四罐樣品編號為 1 號、2-1 號、2-2 號、3 號氣體樣品放至於密封玻璃瓶中，先用排水集氣法將玻璃瓶氣體樣本導入 2L 不鏽鋼採樣罐內，中間用 1/8" 鐵氟龍管 60 公分做連結。之後將四罐採樣罐利用高濃度稀釋系統導入 Zero air 至罐內壓力約達 780torr。

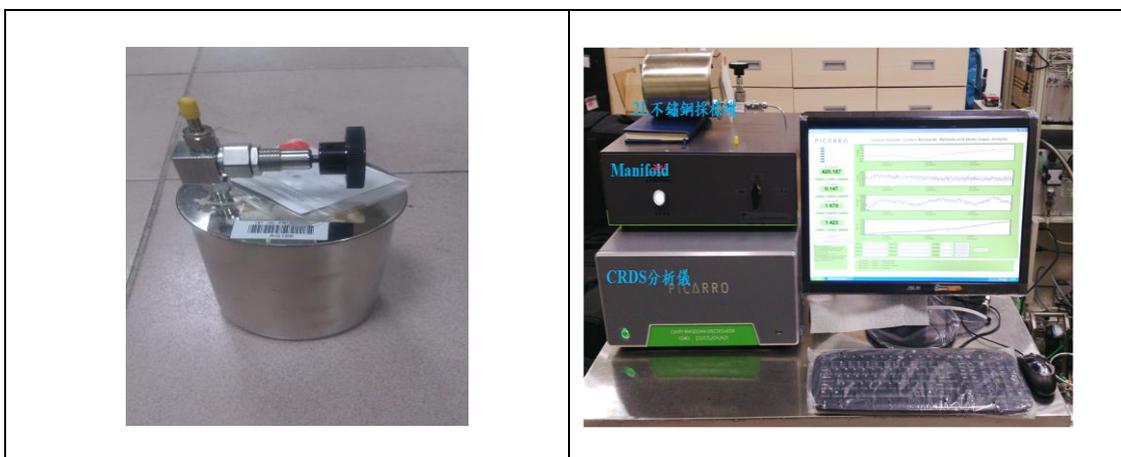
說明：

- 將 1 號和 3 號樣品接上 CRDS 分析系統進行測量。而 2-1 號、2-2 號因為 CO₂ 濃度過高，超出儀器偵測上限，所以必



須將樣品進行稀釋再做分析。

2. 使用高濃度稀釋系統將 2-1 號與 2-2 號樣品稀釋 16 倍後，接上 CRDS 分析系統進行測量。



二、分析儀器:光腔衰盪光譜儀(PICARRO CRDS)

氣體分析結果如下：

罐號(樣品)	CO (ppmv)	CO ₂ dry (ppmv)	CH ₄ dry (ppmv)	H ₂
Real sample 1	ND	ppm : 673.430 體積百分比 0.67%	ppm : 1.947 體積百分比 1.95×10 ⁻⁴ %	體積百分比約 99.66%
Real sample 2-1	2.775	ppm : 183291.759 體積百分比 18.33%	ppm : 1.559 體積百分比 1.56×10 ⁻⁴ %	體積百分比約 81.67%
Real sample 2-2	2.611	ppm : 186204.007 體積百分比 18.62%	ppm : 1.590 體積百分比 1.95×10 ⁻⁴ %	體積百分比約 81.38%
Real sample 3	0.449	ppm : 7671.004 體積百分比 0.77%	ppm : 2.220 體積百分比 2.22×10 ⁻⁴ %	體積百分比約 99.23%

說明：

- (1) 樣品 1 及樣品 3：

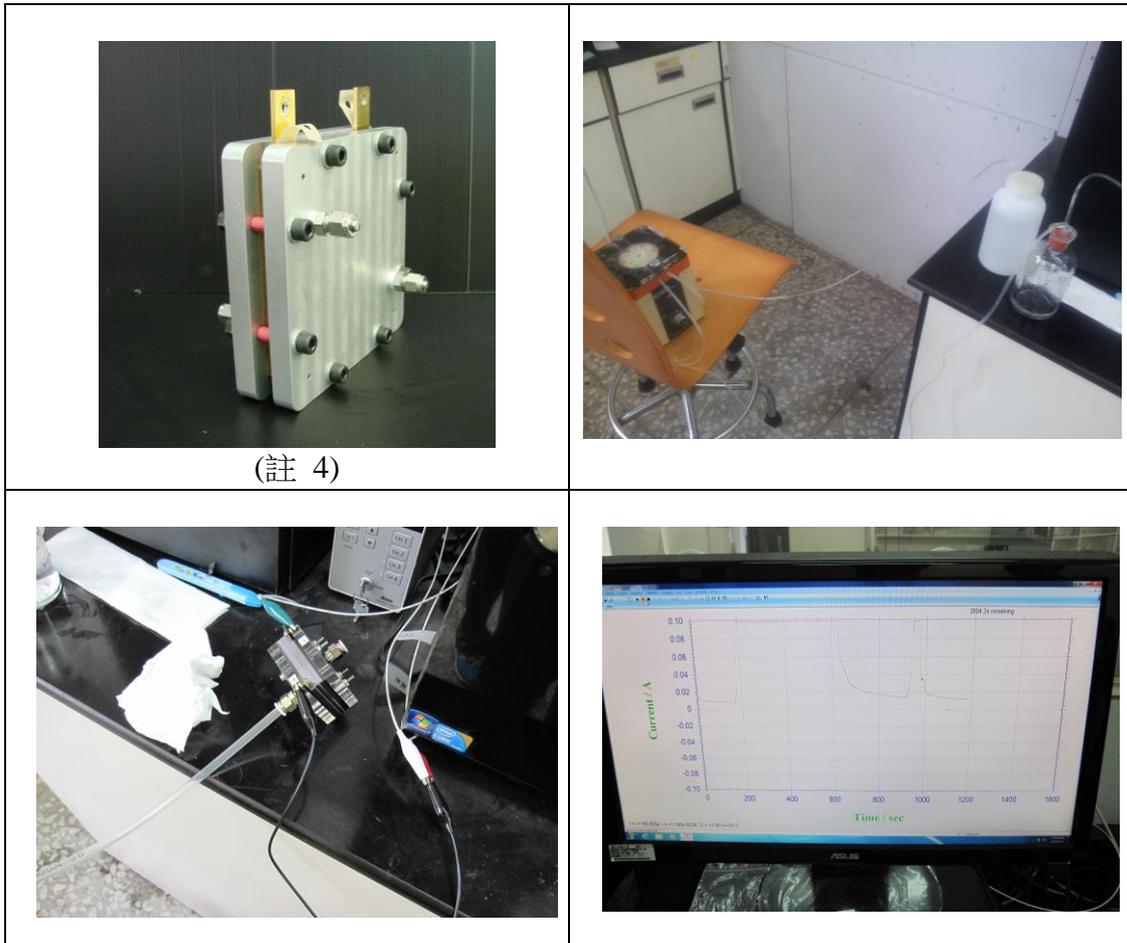
產生的氣體，若通過 0.01N NaOH 時，所測的 CO₂ 的體積約 0.7% 左右，CO 及 CH₄ 的含量非常的少，氣體中含 H₂ 約有 99.66%。

- (2) 樣品 2-1 及樣品 2-2：

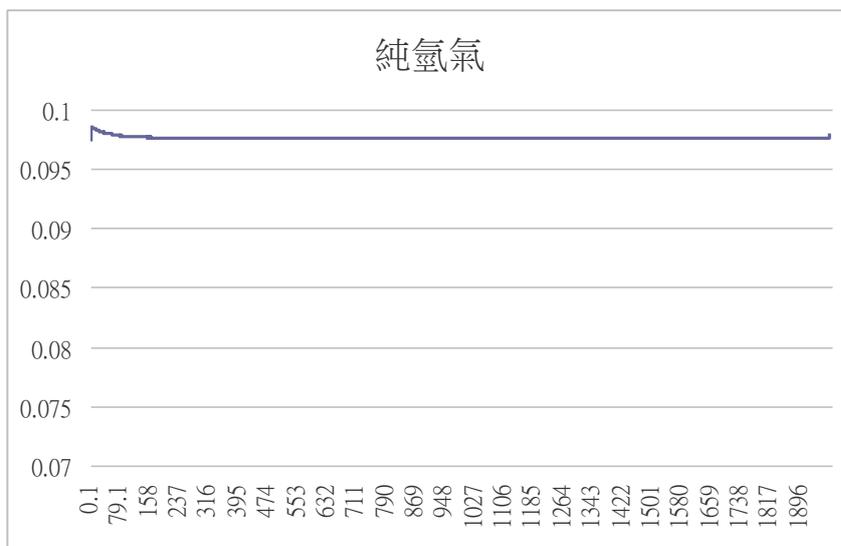
若產生的氣體直接偵測時，所測的 CO₂ 的體積約 18% 左右，CO₂ 含量非常的高，CO 及 CH₄ 的含量非常的少，而氣體中含 H₂ 約有 81%。

第四部分：以產生的 H_2 連接氫燃料電池並測量電池的功率

一、氫燃料電池功率測定(註 3)

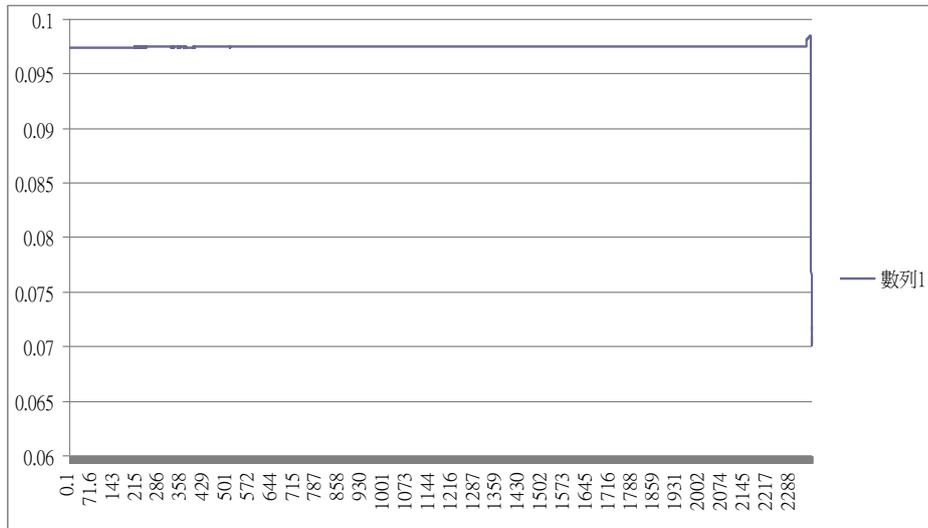


1. 以純氫氣為對照組



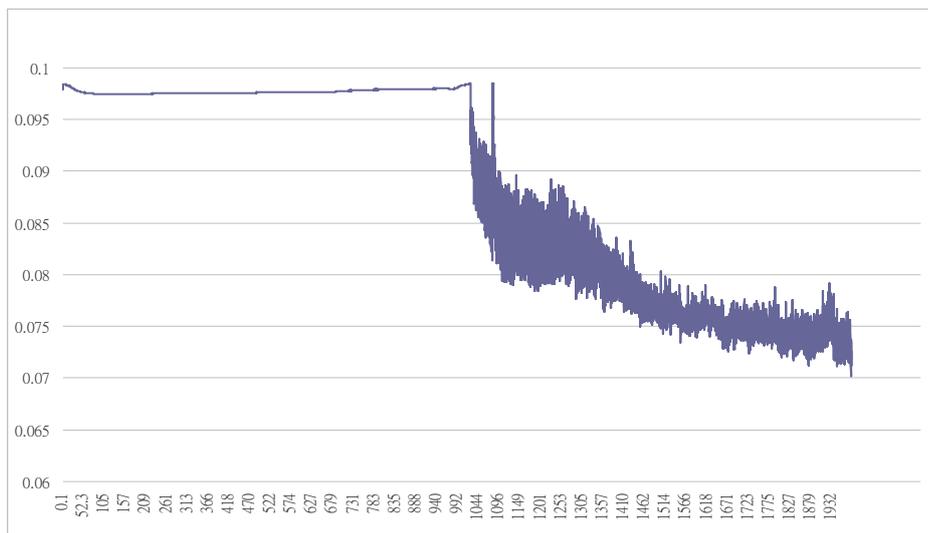
說明：純氫氣在電壓 1.7V 時，測得電流為 0.9A。

2. 產生的氣體通過 0.01N NaOH 時的氣體



說明：實驗中產生的氣體通過 0.01N NaOH 時，其氣體中含 H₂ 約有 99.66%，電壓設定為 1.7V 時，測出的電流亦約為 0.9A

3. 沒有通過 0.01N NaOH 時，其氣體中含 H₂ 約有 81%，其偵測值如下：



說明：若沒有通過 0.01N NaOH，電壓設定為 1.7V 時，測出的電流呈現出不穩定的現象。

陸、實驗討論

1. 在牛糞溶液的先置處理後，經過培養確定溶液中有 4 種菌均為芽孢桿菌屬，但 4 種菌為不同種。查過文獻資料得知芽孢桿菌可以耐熱，所以每一次的實驗中均先經過加熱以去除其他的雜菌，以確定每次實驗的起始菌種是固定的。
2. 在不同的 pH 值測試中，pH 值低於 4 時氣體的產生會停止，其可能原因有二：
 - (1) pH 值低於 4 的時候，芽孢桿菌停止活動。
 - (2) pH 值低於 4 的時候，芽孢桿菌死亡而形成芽孢。
3. pH 值在 6~7 產生氣體的速率最快，於是選用 KH_2PO_4 配製為緩衝溶液，控制 pH 值在 6~7，當 pH 值低於 6 時由 NaOH 再調回 6~7。
4. 由於芽孢桿菌的菌落數很難控制，所以每次的實驗均取 100 克的乾牛糞作為起始實驗的控制變因。
5. 在實驗過程中，也很難在固定時間內計算菌落數，較佳的方式是測量 CO_2 的含量，約略可以看出芽孢桿菌的生長趨勢，又因 CO_2 略溶於水，所以與真正的生長趨勢會有誤差。
6. 在測試氫燃料電池的功率時，以純氫氣當作對照組，測出的電流約為 0.9 A，以實驗中產生的氣體通過 0.01N NaOH 時，其氣體中含 H_2 約有 99.66%，測出的電流亦約為 0.9A，若沒有通過 0.01N NaOH 時，其氣體中含 H_2 約有 81%，測出的電流呈現出不穩定的現象。

柒、實驗結果

1. 在芽孢桿菌測試的實驗中，pH 值在 6~7 為最佳的生長條件，在液面上加入液態石蠟是隔絕空氣快速又簡易的方法。
2. 在芽孢桿菌產生的氣體分析中有 H_2 、 CH_4 、 CO_2 及 CO ，經過分析的結果含 H_2 最高，其次是 CO_2 ，而 CH_4 及 CO 含量非常的少。
3. 產生的氣體經過通過 0.01N NaOH 去除 CO_2 ，氣體分析中 H_2 占 99.66%，可提供未來一個生物產氫的方法。
4. 去除 CO_2 後，測試氫燃料電池，在固定電壓時其測出的電流與純氫作比較幾乎相同，所以本實驗提供一個產能的最佳方式。

捌、未來展望

在廢棄物、廚餘或是生質能中，只要含有含單醣，即可利用此方法產生氫氣，提供一個產能上新的方式。

玖、參考文獻

1. 高中基礎化學(二)翰林版 3-3 化學電池
2. 維基百科
3. 楊久盈《生質能源實作》
4. 國立高雄第一科技大學 賴俊吉副教授 《厭氧氫發酵產物應用於土壤修復之研究》

拾、附記

1. (註 1：菌種確認，台美檢驗測定)。
2. (註 2：中研院環境變遷所測定)。
3. (註 3：宜蘭大學測定)。
4. (註 4：呈友股份有限公司訂做)。

【評語】 040804

1. 能由農牧廢棄物發想，系統化的探討生質能源的再利用，值得肯定。
2. 能學習並運用精密儀器，進行定性與定量的探討，求知的積極態度堪為嘉許。
3. 可進一步於圖表呈現上更為詳細與確實，如座標的物理量或數值尺度，可讓作品更有可讀性。