

中華民國第 54 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高職組 農業及生物科技科

第二名

091408

探討最佳條件培養單針藻產製生質能源併同吸
附重金屬之研究

學校名稱：國立屏東高級工業職業學校

作者： 職二 周楨祥 職二 陳學融 職二 洪宜蓁	指導老師： 許美華
---	------------------

關鍵詞：單針藻、廢水降解、生質能源

摘要

本研究以 *Monoraphidium sp.* 單針藻為試驗對象。首先利用畜牧廢水作為基質培養微藻，瞭解微藻移除廢水營養鹽之能力與生質潛勢，再利用不同光照週期培養，探討不同光照週期對微藻生長特性與生質潛勢之影響，最後利用微藻吸附重金屬，併找出微藻轉酯化後的再利用性。

試驗結果顯示，在不同濃度的畜牧廢水中，生質物濃度以 100 % 添加比例為最佳，併可有效利用畜牧廢水的氮磷營養鹽，TIN、TP 移除率分別可達 97 %、93 % 以上。除了營養鹽，光照也是影響微藻生長之重點之一，微藻於不同光照週期中，以 24 hr 小時連續光照具有較高的生質物濃度與生質物產率(676 mg/L、87.14 mg/L · d)。綜合以上最佳條件進行 *Monoraphidium sp.* 單針藻的培養，再將藻粉用以吸附重金屬，達到去除水質重金屬汙染問題。

壹、研究動機

由於二年級的課程進入了「水」的章節，提到了水污染與防治的重要性，讓人想到了台灣的處境，因此我們想要更深入的探討水汙染的議題。在查閱了許多文獻後，我們發現長期以來台灣南部地區因畜牧廢水處理得不夠完善，而使汙染情形越來越嚴重，尤其養豬場大量排放廢水，雖然大部分的養豬戶都設有廢水處理設備，但是在監督不確實及業者僥倖的心態下，汙染情形仍日以遽增，處理過後的汙水仍含有高濃度的氮、磷營養鹽，導致承受水體優養化的情況很普遍。

另外，水體裡的重金屬含量也是一大課題，我們發現屏東東港溪的重金屬含量超標，尤其是銅金屬，銅金屬會影響生命與生態系的關係，以含銅廢水灌溉農田，銅在土壤和農作物中累積會造成農作物生長不良，特別是水稻和大麥。銅對水生生物的毒害也很大，台灣西部沿海的養殖牡蠣也曾發生銅汙染引起的綠牡蠣事件。綜合以上因素，我們想找出能源匱乏及環境汙染的解決方法。

貳、研究目的

- 一. 找出畜牧廢水最佳培養濃度，進行 *Monoraphidium* sp. 單針藻之培養。
- 二. 找出最佳光照週期，進行 *Monoraphidium* sp. 單針藻之培養。
- 三. 利用 *Monoraphidium* sp. 單針藻降解畜牧廢水中的氮磷營養鹽，改善河川優養化的問題。
- 四. 利用 *Monoraphidium* sp. 單針藻吸附工業廢水中的重金屬，以淨化河川與民生用水。
- 五. 將 *Monoraphidium* sp. 單針藻進行轉酯化，產製生質柴油，改善能源匱乏的問題。
- 六.

參、研究設備及器材

分光光度計(OD)、真空抽氣裝置、精密天平、粗秤天平、乾燥箱、滅菌釜、冷凍乾燥器、真空減壓濃縮機、震盪機、曝氣機、光照裝置、層析級超純水製造系統、高溫灰化爐、打錠機、真空烘箱、高速冷凍離心機、氣相層析色譜儀(GC)、抽風櫃、磁石攪拌器、冷凍冷藏箱、植物生長櫃、原子吸收光譜儀(AA)、KBL8S 標準消化分解爐、凱氏氮蒸餾裝置、COD 消化裝置、索氏油脂萃取儀、光度計。

肆、研究過程或方法

- 一. 本研究架構，如圖 1 所示。

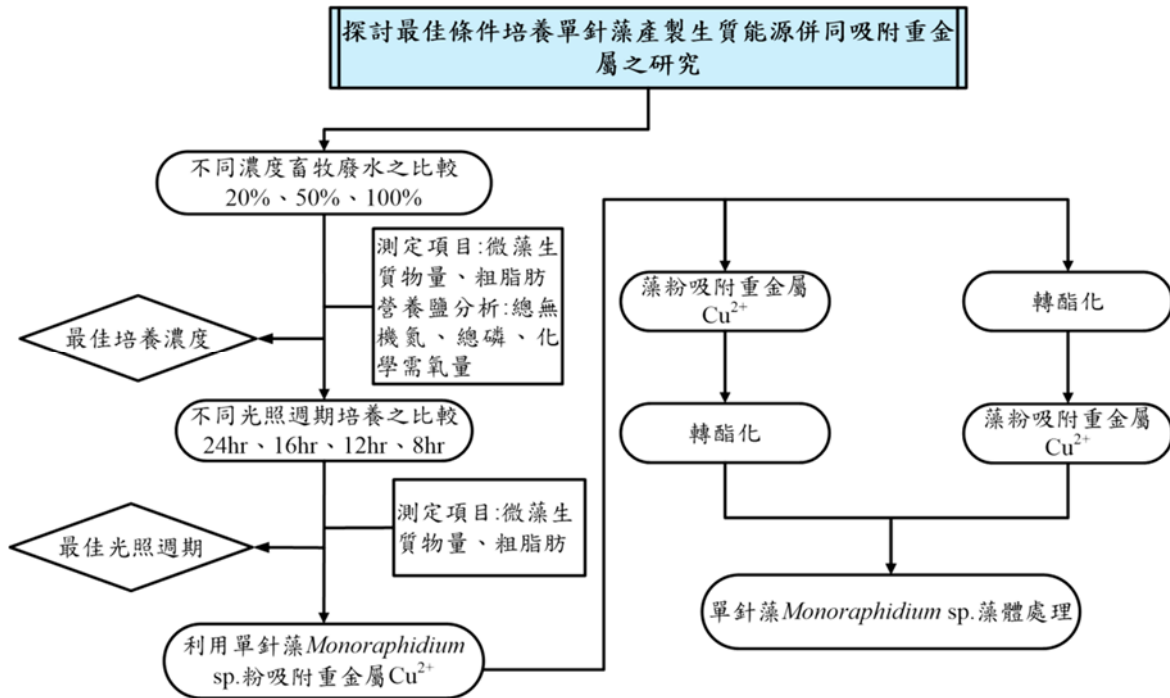


圖 1 研究架構流程圖

- 二. 微藻採樣：於 2013 年 11 月，於屏東內埔工業區進行採樣。

- 三. 微藻的純化與培養：本研究以平板分離法進行單針藻的純化，將配製好的營養鹽溶液 (BG-11)，經高壓滅菌釜滅菌(121 °C 20 min) 後，加入 1.5-1.8 % agar 及少量抗生素，取出後放置無菌操作台等待冷卻，冷卻至約 50 °C 時，於每個無菌培養皿中加入 20 mL 的培養液，冷卻凝固後，以 L 型玻棒沾水樣以劃線法來培養，劃完線後以 paraffin 密封放置於光照下培養，培養皿分離純化的微藻株，再置於 BG-11 營養鹽溶液逐量放大培養，作為試驗之用。試驗過程微藻所用的基質，來自屏東科技大學畜牧場的畜牧廢水。廢水先經微生物濾網過濾，離心，移除固體物後，再經高壓滅菌，作為微藻基質之用。微藻培養條件，溫度 25 °C，光照 5 Klux (24 hr/day)，空氣曝氣，氣液比 0.8 air L/min.L。
- 四. 生質物濃度的測定：預先將濾紙(孔徑 0.45 μm)於 90 °C 烘箱內烘乾 1 小時，再取出濾紙放在乾燥器內 2 小時，待其冷卻至室溫，測其重量。將培養的微藻，吸取 50 mL 的藻液，以真空抽氣過濾機將藻體過濾，再計算濾紙增加的重量以及藻液的體積，獲得藻細胞單位的容積重(生質物濃度)。
- 五. 脂質的測定：秤取適量的乾燥藻粉樣品，置於經乾燥處理過的套管中，並將預先乾燥過的接收燒瓶稱重。再把正己烷/甲醇(2:1, v/v)倒入接收瓶中，裝好接收瓶、索氏萃取裝置和冷凝管(S-416, Gerhardt, Germany)，開始加熱接收瓶，萃取時間約 4~6 小時。接著將含有油脂的接收瓶置於 100 °C 烘箱內乾燥 30 分鐘，冷卻後稱重。利用重量的差異，獲得藻體脂質含量百分比。
- 六. 性質測試與分析：
- (一) 總凱氏氮測定：總凱氏氮為將水樣加入硫酸，在高溫下將氨基氮化合物消化分解轉變為 NH_4^+ ，再測定樣品氮濃度。首先取水樣 250 mL 置於消化管中，並放入沸石和消化液 50 mL，將消化裝置調整至 380 °C，打開迴流裝置和抽氣風扇，並開始加熱。加熱 2 小時將水樣取出，消化分解產生的氨，再依氨氮-靛酚比色法，進行檢測。
- (二) 氨氮測定：取水樣 100 mL 或稀釋適量水樣 100 mL 倒入蒸餾管中，加入 4 mL 硼酸緩衝溶液，並將蒸餾管安裝於蒸餾裝置，吸收瓶內則加入 50 mL 硫酸吸收溶液，開啟蒸餾裝置，收取蒸餾液於吸收瓶，取 50 mL 吸收液或將吸收液適量稀釋至 50 mL，並加入 2 mL 酚溶液、2 mL 亞硝鹽鐵氰化鈉溶液以及 5 mL 的氧化劑溶液，隨後靜置於室溫(22-27 °C)暗處下大約 1 小時，再將水樣置於分光光度計波長 640 nm 中測量吸光值，將此吸光值對應標準溶液檢量線，以求出樣品的氨氮含量。
- (三) 總磷測定：水樣以硫酸、過硫酸鹽消化處理，使其中的磷轉變為正磷酸鹽之型式存在後，再加入鉬酸銨、酒石酸銻鉀生成為磷鉬酸，經維生素丙還原為藍色複合物鉬藍(molybdenum blue)，以分光光度計於波長 880 nm 處測量其吸光度。首先將水樣稀釋到適當倍數後定量至 50 mL，並加入 1 mL 濃硫酸及 5 mL 濃硝酸於消化管內，放入消化裝置中消化至水樣剩餘 10 mL，冷卻後加入約 20 mL

的超純水及 1 滴酚酞指示劑，檢測 pH 值經調整過 pH 值之水樣或適量經稀釋之水樣 50 mL，再加入 8 mL 混合試劑，混合均勻後，於 10-30 分鐘內利用分光光度計於波長 880 nm 處測其吸光值，並由檢量線求出樣品的總磷濃度。

(四) 硝酸鹽氮測定：將水樣以孔徑 0.45 μm 的濾紙過濾，取 50 mL 或稀釋適量之水樣，加入 1 mL 1 M 的鹽酸溶液，完全混合均勻後，取適量水樣置於石英管中，以分光光度計波長 220 nm 及 275 nm 中測量其吸光值，將此吸光值對應標準溶液檢量線，求出樣品的硝酸鹽氮含量。

(五) 亞硝酸鹽氮測定：將水樣以孔徑 0.45 μm 之濾膜過濾，取 50 mL 或稀釋適量之水樣，需要時以 1 N 鹽酸或氫氧化銨調整水樣之 pH 值在 5~9 之間，稀釋到 50 mL，加入 2 mL 呈色試劑，靜置 10 分鐘至 2 小時，再取適量水樣置於石英管，以分光光度計波長 543 nm 中量測吸光值，將此吸光值對應標準溶液檢量線，求出樣品的亞硝酸鹽氮含量。

七. 轉酯化:秤取 0.1g 藻粉置入棕色瓶，在加入 8mL 1N NaOH 並封上封口膜，至入超音波震盪機計時 5 分鐘後拿出放置於真空減壓濃縮機(60°C)計時 30 分鐘後拿出，冷卻恆溫後撕去封口膜，加入 8mL 0.7N HCl 和 10mL BF_3 並封上多層封口膜以減少濃縮時的揮發，置於真空減壓濃縮機(100°C)計時 15 分鐘後拿出，冷卻恆溫後加 2mL 飽和食鹽水與 4mL 正己烷進行生質柴油萃取。

八. 藻體吸附銅金屬溶液實驗:將藻體冷凍乾燥去除水分後之藻粉，各取 0.1g 並同時投入 1L 1ppm~5ppm 的銅金屬溶液進行吸附，持續震盪 90 分鐘後收藻，進行水質重金屬含量分析(利用原子吸收光譜儀 AA)，再算出吸附量及去除率(%)。再將藻體回收處理。

伍、研究結果

一. *Oocystis* sp. 與 *Monoraphidium* sp. 降解畜牧廢水營養鹽之能力

畜牧廢水中含有高濃度的氮和磷等營養來源。一般微藻能利用的氮物種為硝酸態(NO_3^-)、亞硝酸態(NO_2^-)和氨態(NH_3)等可溶性無機氮和尿素等有機氮化合物(周氏，2003)。藉由微藻利用氮磷之能力，淨化畜牧廢水，並瞭解微藻培養期間，營養鹽基質之變化。以兩株優勢藻種為比較，利用畜牧廢水不同添加比例(20、50、100%)為基質，探討 *Oocystis* sp. 卵囊藻與 *Monoraphidium* sp. 單針藻降解畜牧廢水之能力，結果如圖2所示。圖2(A)為 *Oocystis* sp. 卵囊藻於畜牧廢水不同添加比例移除營養鹽之能力，隨著培養時間的增加，水中之營養鹽濃度亦隨之減少，經過7天培養，在所有添加比例中，以畜牧廢水100%比例添加下，TIN、TN、TP移除率為最高，分別為(98.1%、79.7%、93.9%)。圖2(B)顯示，*Monoraphidium* sp. 單針藻培養於不同添加比例畜牧廢水，同樣以100%的添加比例，TIN、TN、TP移除率為最高，移除率分別可達(97.8%、75%及98.6%)。

綜合以上結果，兩株優勢藻種於畜牧廢水中，均可利用畜牧廢水的氮磷營養鹽，TIN、TP 移除率分別可達97 %、93 %以上。

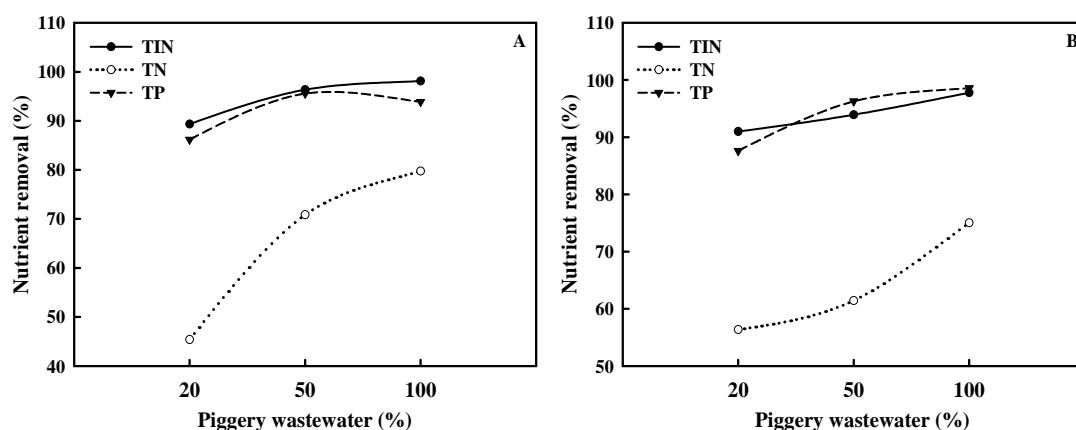


圖 2 微藻移除不同比例畜牧廢水營養鹽之能力，
(A)*Oocystis sp.*，(B)*Monoraphidium sp.*

二. 脂質產率比較

圖 3 為兩株優勢藻種油脂含量與產率的比較。脂質含量分析結果，如圖 3(A)所示，*Monoraphidium sp.*單針藻($32.4 \pm 0.69\%$)、*Oocystis sp.*卵囊藻($23.1 \pm 0.52\%$)，其中以 *Monoraphidium sp.*單針藻有較高脂質含量。欲獲得藻類高脂質產率必須同時考慮細胞生長率與脂質含量，圖 3(B)為優勢藻脂質產率的變化。因為兩株藻的脂質產率差不多，所以我們以脂質含量為依據選出單針藻為本實驗的對象。

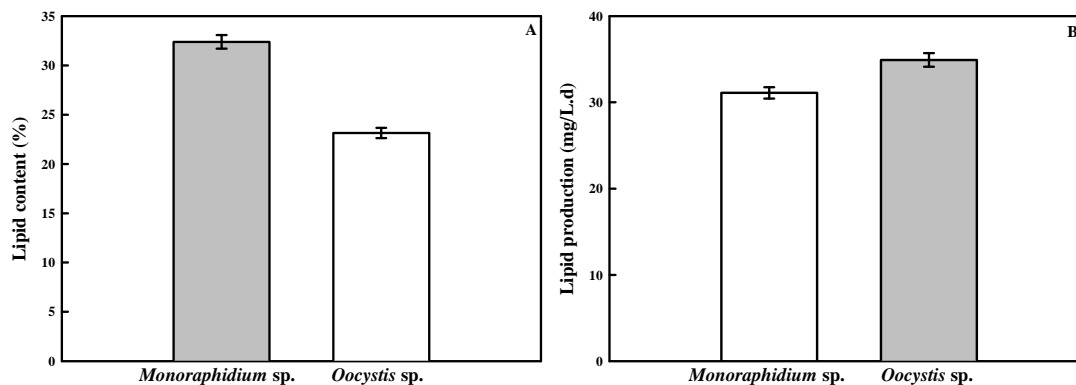


圖 3 畜牧廢水 100 % 添加比例對微藻生質潛勢，
(A)脂質含量，(B)脂質產率

三. 葡萄糖對 *Monoraphidium sp.* 生質特性之影響

由圖 4 可知，以 100% 畜牧廢水添加有機碳最有利於微藻的生長，其生質物產率為 $105.14 \text{ mg/L} \cdot \text{d}$ 。

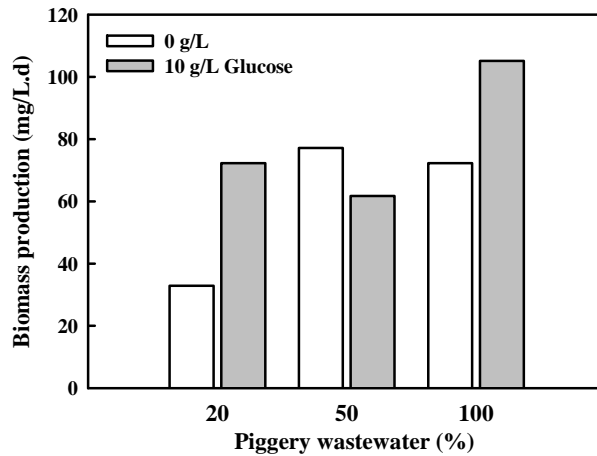


圖 4 畜牧廢水不同比例有無添加葡萄糖對微藻生質產率之影響

四.葡萄糖10 g/L對*Monoraphidium sp.*生質潛勢

圖 5(A)為畜牧廢水不同比例添加葡萄糖條件下，脂質含量變化。由圖發現，畜牧廢水 100 %添加葡萄糖有較高的脂質含量($40.3\pm 0.39\%$)，畜牧廢水 50 %添加葡萄糖，表現次之($38.9\pm 0.62\%$)，而畜牧廢水 20 %添加葡萄糖時，表現較差($37.6\pm 0.41\%$)。圖 5(B)為添加葡萄糖之脂質產率，分別為(42.39 ± 0.41 、 23.99 ± 0.38 、 27.17 ± 0.29 mg/L · d)，以畜牧廢水 100 %為最佳。因此，添加葡萄糖有助於 *Monoraphidium sp.*單針藻提高脂質與脂質產量。劉平懷等(2012)研究結果指出，*Monoraphidium sp.*單針藻於營養鹽中，添加葡萄糖時，同樣可提升脂質含量、脂質產量。

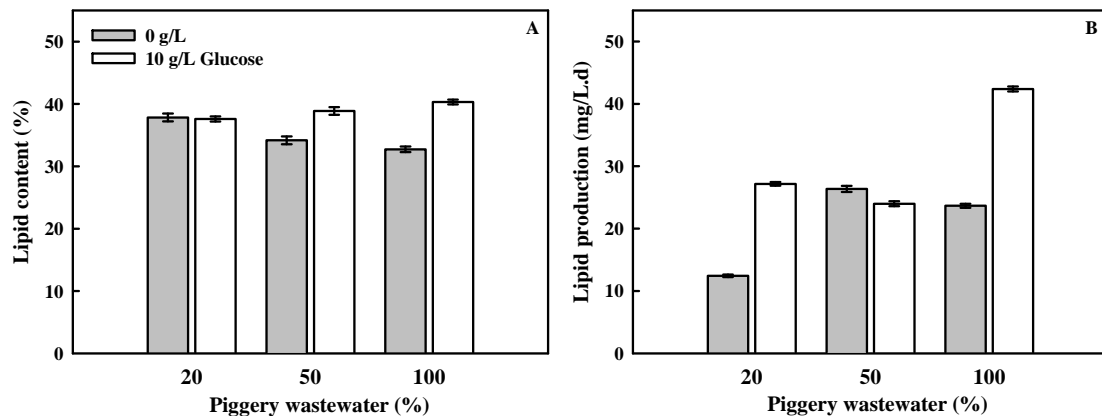


圖 5 畜牧廢水不同比例有無添加葡萄糖 10 g/L 對微藻生質潛勢，
(A)脂質含量，(B)脂質產率

五.不同光照週期 *Monoraphidium sp.*單針藻生長之影響

生質特性分析:圖 6(A)與圖 6(B)分別為生長速率與生質物產率，由圖發現到生長速率與生質物產率皆由以營養鹽 24 hr 連續光照所培養之 *Monoraphidium sp.*單針藻為最佳，*Monoraphidium sp.*單針藻生質物產率為(87.1429 mg/L.d)。

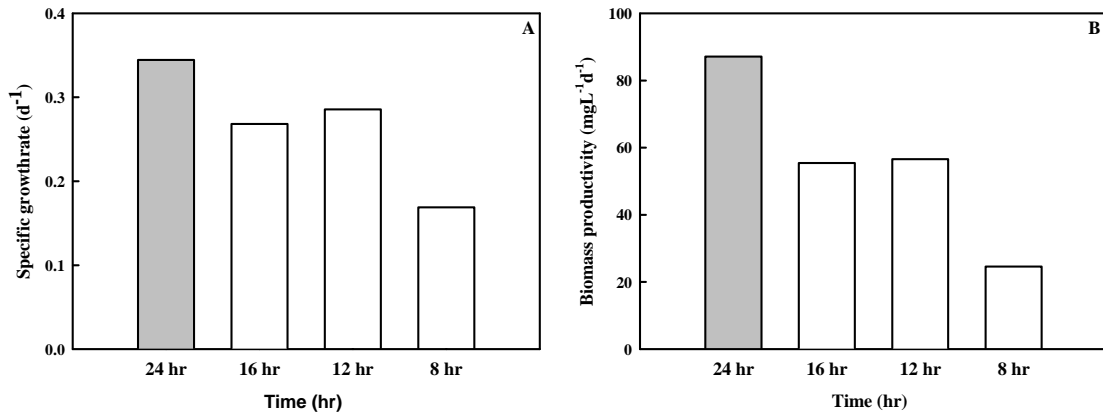


圖 6 不同光照週期之微藻生長特性，
(A)生長速率 (B)生質物產率

生質潛勢之變化:不同光照週期的條件下，對 *Monoraphidium* sp. 單針藻生質潛勢之比較，顯示於圖 7。圖 7(A)為不同光照週期條件下，脂質含量變化。由圖發現，以 12 hr 的光照週期有最佳的脂質含量，而 24 hr 的連續光照則次之，最差的為 8 hr 光照週期所含脂質含量為最少，脂質含量分別為(33.52±0.4、31.37±0.3、38.26±0.3、26.48±0.35%)。圖 7(B)為不同光照週期下，脂質產率。由圖發現，以 24 hr 連續光照有最高的脂質產率，12 hr 的光照週期為次之，原因為 24hr 的生質物濃度高所以相對的脂質產率較高，雖然 12hr 的光照週期所培養的 *Monoraphidium* sp. 單針藻脂質含量較高，但因為他的生質物濃度比 24hr 的低，所以相對的脂質產率就較 24hr 光照週期的低，各週期之脂質產率分別為(29.09±0.39、17.15±0.4、22.28±0.3、7.41±0.5 mg/L.d)。

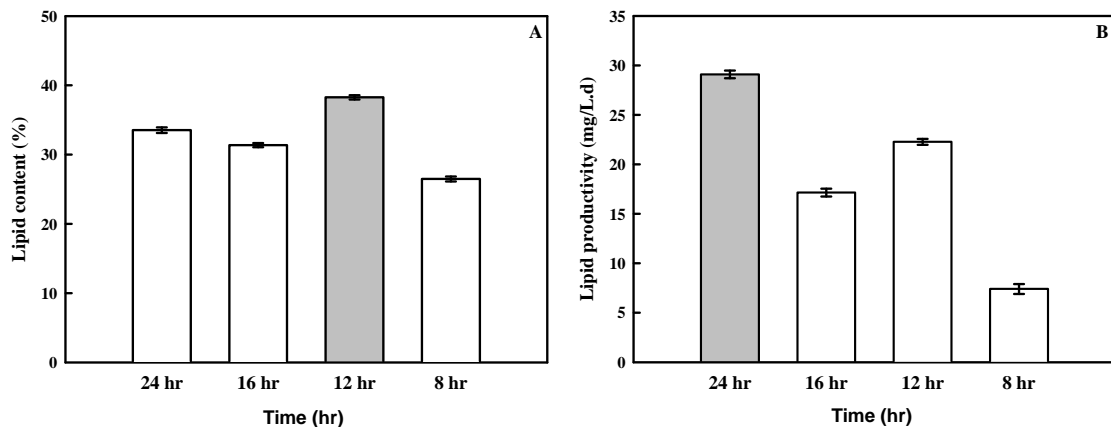


圖 7 同光照週期之微藻生質潛勢，
(A)脂質含量，(B)脂質產率

六.重金屬吸附:表 1 為我們利用 *Monoraphidium* sp.單針藻於不同濃度的銅金屬溶液進行吸附的結果。

表 1.單針藻在不同濃度銅金屬溶液之去除率

藻體種類	原始濃度 (ppm)	吸附後濃 度 A(ppm)	吸附後濃 度 B(ppm)	平均值 AB(ppm)	去除率 (%)
單針藻	0.88	0.22	0.20	0.21	23.86
	1.94	0.36	0.39	0.38	19.33
	3.06	0.46	0.47	0.46	15.20
	4.03	0.49	0.50	0.50	12.28
	5.58	0.62	0.57	0.60	10.66

實驗結果顯示 *Monoraphidium* sp.單針藻對重金屬是有吸附的能力，所以利用微藻去除水質中的重金屬是可行的方式，結果顯示出在高濃度的銅金屬溶液之銅離子去除率較低，而在低濃度的銅金屬溶液之銅離子去除率較高。利用藻類去除水體中的銅金屬具有以下優點：如去除效率高、適用範圍廣、吸附容量大、無二次污染等；但目前這項技術仍然存在許多問題需要解決：

(一)在固定藻類方面，廢水中操作的穩定度及吸附後洗脫所用的試劑多為酸鹼溶液，對活藻細胞也有殺傷力。

(二)解決藻細胞的滲漏問題、選擇最好的固定載體與固定方法、開發合理的生物反應器、採用溫和的洗脫液等等問題，也是今後研究方向。

陸、討論

- 一.東港溪銅金屬汙染超標，但水裡可能也含有其他重金屬。
- 二.利用轉酯化後的藻粉與未轉酯化的藻粉進行重金屬的吸附，研究發現未轉酯化的藻粉有吸附能力而轉酯化後的藻粉無吸附能力，推測藻粉在轉酯化後因藻體被嚴重破壞導致藻體無法進行吸附。
- 三.我們起初以濃度 30ppm 的銅金屬溶液進行吸附試驗，但分析結果發現銅離子並無明顯的去除，推論金屬溶液的濃度若太高，藻體吸附後的濃度可能為誤差值，而顯得並沒有吸附或去除的作用。
- 四.未來希望以太陽光進行藻類的培養，並善用太陽光能源同步以太陽能板儲存電量用以延續夜間的連續光照，使藻體之生長大大受益，達到最佳狀態。

柒、結論

- 一. 利用畜牧廢水作為基質，培養結果 *Monoraphidium* sp.單針藻具有較高的脂質產率 (31.1±0.66 mg/L.d)。
- 二. *Monoraphidium* sp.單針藻於 100 %畜牧廢水並添加葡萄糖之條件，能有效提高微藻生質產率，其生質物產率為 105.14 mg/L · d。
- 三. *Monoraphidium* sp.單針藻於不同光照週期中，培養結果以 24 hr 有較高的生質物濃度與脂質產率 (676 mg/L、29.09 ± 0.39 mg/L · d)。
- 四. 要去除汙染物，若能以 24hr 連續光照，提升藻體的生質物濃度，將會增加去除汙染物質的量，達到更佳的效果。
- 五. 以轉酯化後的藻粉與未轉酯化的藻粉進行銅金屬溶液的吸附，發現以未轉酯化的藻粉具有吸附的能力，而轉酯化後的藻粉無吸附能力。
- 六. 將藻體於不同濃度的金屬溶液中進行吸附，發現濃度愈高，吸附效果愈差。

捌、參考資料及其他

- 一. 于海峰、賈士儒、董永勝、林永賢，2008，“有機碳源對發狀念珠藻單體藻類細胞的生長和光合作影響”，高校化學工程學報，第二十二卷，第二期，第 277-281。
- 二. 王建龍，陳燦，2010，“生物吸附法去除重金屬離子的研究進展”，環境科學學報。
- 三. 郭書吟，2006，“以雜草吸附受汙染土壤中重金屬之探討”，朝陽科技大學碩士論文。
- 四. 陳瑞仁，2013，屏東縣政府環境保護局河川水質監測計畫。
- 五. 劉平懷、楊勤、時杰、郝宗娣、張森，2012，“有機碳源對單針藻細胞生長、油脂積累和光合作用的影響”，食品工業科技，第三十三卷，第十八期，第 224-226。
- 六. Elsey,D., D. Jameson, B. Raleigh, and M. J. Cooney, “Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids,” J. Microbiol. Methods, Vol.68, pp. 639-642(2007).
- 七. Kimura, K., M. Yamaoka, and Y. Kamisaka, “Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence,” J. Microbiol. Methods, Vol.56, pp. 331-338(2004).

【評語】 091408

1. 利用畜牧廢水培養單針藻，再應用此藻類具有金屬離子吸附特性，去除工業廢水中之重金屬；同時達到廢棄物再利用與去汙染之目的，具有實用性。
2. 利用藻類具生物性轉酯化之能力，進行生質能源之開發與應用，具有開發潛力。
3. 能用正確的科學方法提出問題並設計實驗。
4. 團隊表達能力佳。
5. 實驗記錄完整詳實。