

利用脫色代謝中間物以提高生物觸媒產電及脫色處理效能之可行性研究

劉士琦, 陳博彥*

國立宜蘭大學化學工程與材料工程學系

* E-mail: boryannchen@yahoo.com.tw

摘要

先前研究[1]指出脫色中間物可能具有扮演產電中介物來提高產電之能力。再者，於微生物脫色和產電是競爭關係[2]之前提下，在微生物可釋出之電子通量固定條件下，以低毒性之產電中介物來誘導微生物更有效釋放出更多電子，以提高產電和脫色效率極為重要。由於大部分的產電中介物多具有生物毒性，因此首先以批次脫色及生物呼吸儀分析來討論產電中介物之可行劑量，本研究更進一步以*Acinetobacter johnsonii* NIUx72 混菌電池以及*Aeromonas hydrophila* NIU01純菌電池來驗證產電中介物和微生物產電之間的關係，藉由添加不同劑量中介物進入電池以及廢水處理過程中，比較各種產電性能之變化以及比脫色速率(SDR)、比生長速率(SGR)，進行劑量反應之毒性分析，以定義出微生物燃料電池低毒性進行脫色中間物添加以促進產電及脫色最佳添加操作策略，本研究並對數種可能之產電中介物進行可行性評估。並以化學結構差異為著眼，推測出可能具有產電中介作用之化學結構，以利於後續應用。

關鍵字：染料脫色、微生物燃料電池、電子梭、交流阻抗頻譜

NSC Project no.: NSC 98-2221-E-197-007-MY3

1 簡介

微生物燃料電池(MFCs)是近年來另一種新興之替代生質能源之代表。目前MFC的研究多考慮結合了生物產電以及廢水處理以進行能源回收再利用，是以更符合綠色永續之搖籃至搖籃之生態設計概念。而由於微生物處理染整廢水多在厭氧條件下，先前研究更指出在胞內偶氮還原酵素之催化下，裂解偶氮染料中的偶氮鍵，會產生脫色代謝芳香胺之中間物[3、4]，此類芳香胺中間物更能藉由好氧條件下進一步經由羥基化(hydroxylation)和開環(ring-opening)反應而進行降解，

更可將染整廢水完全處理，以期可將環境污程度染降低至最小。研究更推測脫色代謝中間物極可能具有可以作為傳電中介物的能力[5]，在部分研究中亦提及此類中間物可能亦具有提高微生物脫色效率的可能性[6]，但研究[5]同時亦指出此類芳香胺中間物具有抑制生物生長之毒性，若是生物毒性過高，勢必將導致微生物數量、生物活性降低，無疑地將產電微生物之處理能力形成嚴重之威脅，因此本研究將深入探討此類芳香胺中間物對於MFCs會產生之影響，以期了解在MFCs操作處理染整廢水時，將產生之結果。

事實上，微生物產電至少須經三個反應機制來進行：(1)細胞膜結合氧化還原蛋白(例如：細胞色素)，(2)電子經由氧化還原介質來傳遞(例如：吩嗪(phenazine)，醌(quinones))，(3)導電鞭毛(或奈米線)產電菌群(例如*Geobacter sp.*與*Shewanella sp.*)[7、8]，然而若在MFCs中微生物附著在電極表面形成生物膜以產電之微生物數量是固定的前提下，除改變電極表面性質外，實難以有效提高單位時間內電極上細胞膜可釋出之總電子數。再者，由於導電鞭毛之產電菌群生物多樣性較低，因此若想提高MFCs之產電效能，其最可行操作策略應是加入外源性氧化還原電子梭之介質，然而此勢必造成MFCs產電以及廢水處理之成本提高，若能藉由處理染整廢水所產生的芳香胺中間物，可扮演此額外添加之外源性氧化還原介質之角色，如此可避免為求提高電池效能卻外加可能造成二次污染之化學物質。如此在脫色過程中，此類芳香胺中間物更可作為加速產電及脫色之媒介，以提高廢水處理之效率。

本研究取定*Acinetobacter johnsonii* NIUx72混菌電池以及*Aeromonas hydrophila* NIU01純菌燃料電池作為研究對象以進行添加模式芳香胺中間物之可行性評估，測試是否可有效提高微生物產電之效能，以模擬MFCs處理染整廢水產出芳香胺中間物對電池之影響。首先對添加物之生物毒性進行分析，評估在何種劑量下加入MFCs可防止抑制產電微生物活性之產生，並且可使微生物有效利用中間物為媒介以促使脫色產電發揮至最佳效能。過程中，更使用電化學分析儀、電化學交流頻

譜儀為媒介，來估計電池功率密度、極化曲線與電池之內阻變化，以探討芳香胺中間物對電池電化學之影響。最後更針對模式芳香胺中間物是否具有提高微生物脫色效能之能力，以探討中間物對脫色微生物活性之影響。在學理而言，染料脫色是種還原脫色之作用，需要微生物在有機物氧化之過程釋出電子，以提供給偶氮染料來進行脫色。相似原理下，MFC則是在釋出電子後，以陽極作電子接受體，電子再經由外電路來到陰極，使染料或是氧氣接收電子，而內電路則是生成水。由於整個操作上亦是電子轉移之過程，因此染料脫色與微生物產電可視為一體兩面之作用關係。本研究亦試圖解讀，在以添加低毒性而且可能作為產電中介物之產電效能分析，以推論在連續操作下可運用之操作策略。

2 材料與方法

2.1 微生物燃料電池製作與培養條件

所使用之單槽式微生物燃料電池 (single chamber MFCs, SC-MFCs)，MFCs 之啟動操作馴養方法則詳見 [9]。使用菌株為 *Acinetobacter johnsonii* NIUx72 [10] 為主之混菌以及 *Aeromonas hydrophila* NIU01 [19] 純菌，微生物燃料電池之菌株培養方法及培養基組成則參考文獻 [9]。

2.2 模式芳香胺中間物之選擇與毒性分析

2.2.1 芳香胺中間物

所使用之模式芳香胺中間物為同分異構物 2-Aminophenol (2AP)、3-Aminophenol (3AP)、4-Aminophenol (4AP) (Acros Organics Co., Inc., USA)。先前文獻 [5] 指出由於 3AP 本身並不具有共振結構來有效作為傳電中介物之能力，然而 4AP 與 2AP 皆具有傳遞電子之能力，分子結構上更允許可與兩個質子與兩個電子進行耦合進行氧化還原的可逆反應 [11]，但由於 4AP 毒性過高 (即低濃度即具有高毒性響應)，不利於微生物生長，因此本研究主要使用 2AP 以作為模擬處理染整廢水所產出可能具有作為外源性氧化還原電子傳遞介質之芳香胺中間物。

2.2.2 毒性分析

首先取定 MFCs 內之菌液 0.5ml 殖入 50ml 之 LB 培養液中，在 30℃，125 rpm 恆溫好氧培養 12 小時後，取 0.5ml 殖入 300 mL 血清瓶內含 0.2 xLB 50ml 培養液以及各種不同濃度之 2AP 後接上 Micro-Oxymax 封閉式迴路生物呼吸儀 (Columbus Instruments 7395-B20, USA)，在 30℃，125 rpm 恆溫水槽中進行好氧培養 48 小時。生物呼吸儀之校正則以 1000 mL 之標準氣體 CO₂ (0.5%) 進行。理論上在好氧培養過程中，生長時伴隨二

氧化碳之平行生成，因此藉由生物呼吸儀來估算 CO₂ 累積量以瞭解芳香胺中間物對微生物生長活性之影響，進而以劑量響應曲線 (dose-response curve) 分析 [12] 2AP 對微生物所產生的毒性作用，取定在較低毒性劑量 EC₁₅、EC₃₀ 下加入微生物燃料電池中以作產電性能之比較分析。

2.3 電化學分析

2.3.1 極化曲線、功率密度

以電化學工作站 (electrochemical workstation) (Jiehan 5600, Taiwan) 在電池達到穩定電壓輸出後，使用線性伏安法以進行極化曲線的量測 [13]，本研究採用常見的三電極系統，極化曲線量測溫度約在 20±1℃ 中，參考電極為氯化銀電極 (Ag/AgCl, KCl (sat.) E₀=0.199 V)，輔助電極為白金電極 (99.9%, 10mm×30mm×0.1mm)，工作電極為電池陰極 (carbon cloth, 22.9 cm²)，對微生物燃料電池量測前，參考及輔助電極先行浸入 30% H₂O₂ 進行消毒滅菌約 1 小時，而後浸入無菌去離子水 (D.I water) 約 1 小時消除電極上殘留之 H₂O₂ [14]；對電池菌液由下而上通入曝 30 分鐘氮氣以去除可能殘留之微量氧氣。電池在電化學量測前先量測量開路電壓即無外電阻條件下之電壓值，並以開路電壓值作為電位掃描之極值 (例如：若電池在電壓穩態輸出狀態下的量測獲得開路電壓為 0.5 V，則設定線性伏安掃描範圍為 0-0.50 V，並作慢速掃描 (即掃描速率 scan rate ≤ 1 mV s⁻¹) 以獲得極化曲線之數據，若是掃描速率高於 1 mV s⁻¹ 則會造成功率密度被高估之現象，極化曲線的量測範圍在 0~1V 之間，掃描速率 1mV s⁻¹，而輸出功率、功率密度及電流密度的計算可由

$$P = U^2 / R, P = IU / A, i = I / A$$
 (A 為電池陰極面積) 來求得。

2.3.3 交流阻抗分析

利用電化學交流頻譜儀 (HIOKI 3522-50, Japan) 以測量 MFCs 交流阻抗頻譜 (Electrochemical impedance spectroscopy, EIS)，以二極法 MFCs 陽極作為工作電極，陰極作為參考電極與輔助電極 [15]，在電壓輸出穩定開路條件下，自頻率 104 至 5×10⁻³ Hz 進行正弦擾動振幅為 10.0 mV (Logan, 2008)，所得之資料使用 Zview 2.6b (Jiehan Tech.) 軟體程式分析 Nyquist 圖。獲得的阻抗圖 (EIS curve) 與 x 軸的截距則為實際阻抗 (real impedance, Z_{re})，可作為電解質電阻 (electrolyte resistance, R_{el})；阻抗圖中的曲線在 x 軸交點後的曲線投影長度是反應動力電阻 (kinetic resistance) 與質傳電阻 (diffusion resistance) 之和 (R_{kin} + R_{diff}) [15]。藉由將溶液電阻

(R_s)、電極表面電阻(R_{ct})、電極表面電容(CPE-T)、Warburg 擴散阻抗(W_s -R)所組成的等效電路，以瞭解電池內阻之變化[16]。

2.4 染料脫色

本研究使用之模式染料 Reactive Blue 160 (RBU 160)(Everlight Chemical Ltd Co., Inc., Taiwan)，藉由搖瓶脫色試驗[24](培養條件為 0.2x LB，於 30°C、125rpm 染料濃度為 200 mg L⁻¹)來添加模式芳香胺中間物(2AP)，以測試是否可提高微生物脫色效率，過程中則以分光光度計量測染料(染料 RBU 160 之最大吸收峰 λ_{max} =616nm)和菌體(λ_{max} =600nm)之濃度。其估算方式詳見如下：

取定未經離心之原菌液樣品之量測值為

$$OD_{600\text{ nm}}^{X+dye} = OD_{600\text{ nm}}^{dye} + OD_{600\text{ nm}}^X \dots (1)$$

經高速離心(12000 rpm; 15000 Xg) 5 分鐘後，取上層澄清液(假設只含染料)量測所得值為

$$OD_{600\text{ nm}}^{\text{sup}} = OD_{600\text{ nm}}^{dye} \dots (2)$$

經高速離心(12000 rpm; 15000 Xg) 5 分鐘後，取上清液

$$(假設只含染料)所得值為 \quad OD_{\lambda\text{ max}}^{\text{sup}} = OD_{\lambda\text{ max}}^{\text{sup}} \dots (3)$$

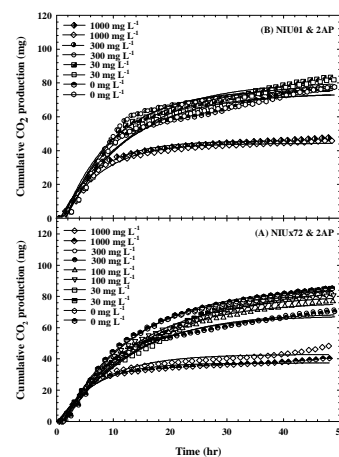
將此三式聯立則可得到染料濃度($OD_{616\text{ nm}}^{Dye}$)及菌體濃度 $OD_{600\text{ nm}}^X$ 【(1)-(2)】，在適當稀釋倍數於線性範圍下(約 O.D.<1)，經濃度校正曲線估算出實際濃度，菌體及染料濃度時間曲線經轉換估算出比生長速率(Specific growth rate, SGR)、比脫色速率(Specific decolorization rate, SDR)以探討添加之芳香胺中間物對微生物脫色之效應。

3 結果與討論

3.1 毒性分析劑量響應曲線

藉由生物呼吸儀估算 CO₂ 累積時間曲線(圖一)，可明顯看出中間物 2AP 確實具有毒性，在對數生長期時，添加不同濃度的 2AP 對產電微生物 NIUx72 混菌、NIU01 純菌，具有不同程度的之毒性作用，就 0.2 x LB 為測試培養基下，在不同劑量之 2AP 添加下，對 NIUx72 混菌生長活性毒性大小(單位:mg L⁻¹)為 2AP(1000) > 2AP(300) > 2AP(100) > 2AP(30) (圖一)，對 NIU01 純菌之毒性大小(單位:mg L⁻¹)則為 2AP(1000) > 2AP(100) > 2AP(300) > 2AP(30)(圖一)，越高之 CO₂ 累積量代表其抑制作用亦相對降低，藉由動力學回歸參數計算得到劑量響應曲線(圖二)更可用來推知芳香胺中間物在何種添加劑量下較為可行。在此取定，劑量濃度 EC₁₅、EC₃₀

作為產電測試之依據，以探討可能因毒性抑制而影響產電性能或是處理污染物之原因，表一更指出，對 NIUx72、NIU01 而言，2AP 之反應濃度有所不同(像是 EC₁₅(mg L⁻¹): 224.52(NIUx72) < 512.06(NIU01)，EC₃₀(mg L⁻¹): 479.07(NIUx72) < 1607.72(NIU01))，顯示出 NIU01 純菌對芳香胺中間物(2AP)毒性容忍耐受能力較 NIUx72 為高，可能可在更高之 2AP 濃度下來提高產電效能。

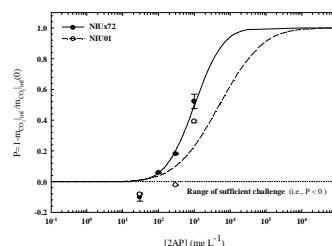


圖一: 2AP 不同濃度下，CO₂ 累積生成監測之時間曲線(回歸線取定時間 48hr)(其估算原理詳見[5])

表一: 依 2-酚胺毒性之響應曲線所求出之毒性有效劑量濃度值

	NIUx72	NIU01
EC ₀	30.93	25.69
EC ₁₅	224.5	512.1
EC ₃₀	479.1	1608
Y = A+B logZ	Y=0.2455+1.5798 logZ	Y=1.1247+1.0465 logZ

單位: mg L⁻¹



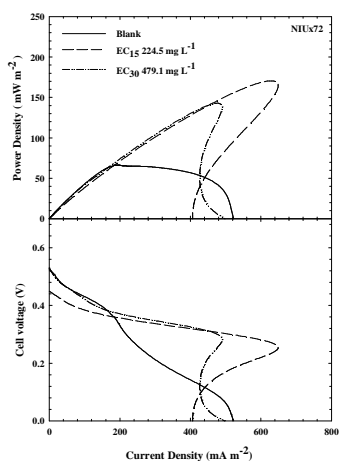
圖二: NIUx72 混菌、NIU01 純菌對不同濃度 2AP 之毒性劑量響應曲線(模式估算邏輯可參考[12])

3.2 電化學分析

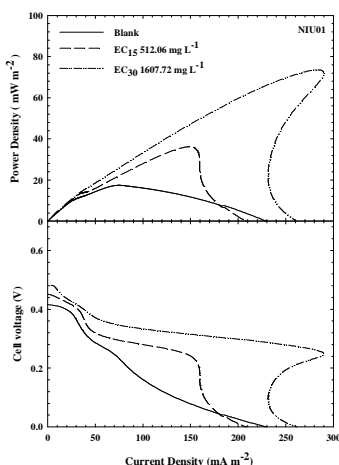
3.2.1 極化曲線和功率密度差異分析

中間物 2AP 在以 0、EC₁₅、EC₃₀ 濃度下添加入 MFCs 前後進行比較(圖三、四)，其功率密度在加入 2AP 後，急遽上升，混菌 NIUx72 電池可由 66.44 提高至

170.51 再降低至 142.9 (mW m^{-2}) 最高將增加 2.56 倍，代表在 EC_{15} 濃度下 2AP 之毒性抑制產電作用較不明顯，但是增至 EC_{30} 濃度時其抑制作用即逐漸顯著而 NIU01 純菌電池則可由 17.4 提高至 36.1，再提高至 73.56 (mW m^{-2}) 最高可增加 4.23 倍，亦即代表在 EC_{15} 、 EC_{30} 濃度下，均不具有毒性抑制作用。可看出脫色中間物 2AP 確實具有對此二微生物燃料電池均具有大幅提升其生物產電的能力，比較亦指出純菌 NIU01 比混菌 NIUx72 更能利用 2AP 做為傳遞電子之產電中介物。



圖三：以低毒性劑量 2AP 下對 NIUx72 之混菌 MFC 之功率密度響應曲線 (2AP 濃度分別取定在 0 (Blank)、 EC_{15} 、 EC_{30} 濃度下 (即 0 mg L^{-1} 、 224.5 mg L^{-1} 、 479.1 mg L^{-1})，相對應之最大功率密度分別為 66.44 mW m^{-2} 、 170.51 mW m^{-2} 及 142.88 mW m^{-2} 。



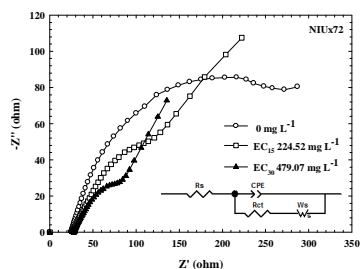
圖四：以低毒性劑量 2AP 下對 NIUx01 之純菌 MFC 之功率密度響應曲線 (2AP 濃度分別取定在 0 (Blank)、 EC_{15} 、 EC_{30} 濃度下 (即 0 mg L^{-1} 、 512.1 mg L^{-1} 、 1608 mg L^{-1})，對應之最大功率密度分別為 17.44 mW m^{-2} 、 36.14 mW m^{-2} 及 73.56 mW m^{-2} 。

3.2.2 功率「突衝」現象 (Power overshoot) 分析

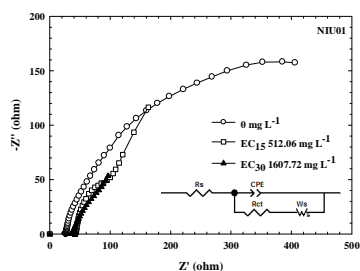
在過程中，由圖三、四亦可發現另一獨特產電特性即「突衝」現象 (Power overshoot) [17、18]，此現象乃發生在於 MFCs 之阻抗改變，而陽極生物膜更無足夠時間來適應此變化，導致無法產出足夠的電流來應對這種變化，使得功率密度曲線本身發生「雙迴」(doubling back) 現象，電流密度無法進一步有效提升。而由圖可知在最大功率密度前其電流密度確實可有效上升，亦連帶使得功率密度亦平行上升，然而在超過最大功率密度之後，由於陽極生物膜上之菌體尚未習慣改變在低電阻高電流之環境，產出之電流跟不上電阻之變化造成電流密度無法進一步上升發生「突衝」現象 (Power overshoot)，由 $U = IR$, $P = U^2 / R$, $P = IU / A$, $i = I / A$ 可知當電流產出無法再上升，由於阻抗下降電壓無法獲得提升，但由於電流上升，阻抗下降，功率密度確實獲得提升之效果。由文獻[18]亦指出，同一種類 MFCs 在發生 Power overshoot 現象時，其最大功率密度會低於未發生此現象之電池，然而本研究卻因添加芳香胺中間物 2AP 使同一電池內發生 Power overshoot 現象，其最大功率密度卻大幅上升，此點亦說明 2AP 確實具有提高生物產電之能力。

3.2.3 交流阻抗分析

分析 MFCs 之功率密度變化以及發生「突衝」現象 (Power overshoot)，合理推斷添加中間物 2AP 可能具有改變 MFC 內阻之能力。功率密度的提高代表電池受到中間物 2AP 作為促進電子輸出的傳電中介物增加電子輸出，發生「突衝」現象代表 MFC 內部電阻可能發生變化，藉由分析 Nyquist 圖 (圖五、六) 得知溶液電阻 (R_s)、電極表面電阻 (R_{ct})、電極表面電容 (CPE-T)、Warburg 擴散阻抗 (W_s -R) 所組成的等效電路圖中各阻抗元件之變化[23]，由表二得知 2AP 的添加使得電極表面電容 (CPE-T) 獲得提高，增加了電池電容可儲存之電量，代表電池產電的性能越好。而電池內阻中電極表面電阻 (R_{ct})、Warburg 擴散阻抗 (W_s -R) 皆獲得大幅下降。電阻的改變解釋了為何添加 2AP 會造成「突衝」現象，電容的增加亦解釋了電池放電量增加使得功率密度獲得提升。由於 2AP 作為電子梭之存在，使得電池效能獲得提高即使發生「突衝」現象亦不會降低其功率密度。



圖五: 混菌電池 NIUx72 添加 2AP 在 0(Blank)、EC₁₅、EC₃₀ 濃度下之交流阻抗圖



圖六: 純菌電池 NIU01 添加 2AP 在 0(Blank) EC₁₅ EC₃₀ 濃度下之交流阻抗圖

表二: MFCs 各種阻抗元件隨著 2AP 的添加產生變化

電池、中介物濃度	R _s	CPE-T	W _s -R	R _{ct}
NIUx72	25.09	7.193	266.6	248.9
NIUx72 & 2AP EC ₁₅	27.33	11.28	169.2	160.9
NIUx72 & 2AP EC ₃₀	27.81	17.19	127.6	88.17
NIU01	26.02	8.647	280.7	514.4
NIU01 & 2AP EC ₁₅	41.66	27.16	199.2	83.61
NIU01 & 2AP EC ₃₀	36.53	59.39	142.6	147.2

R_s: 溶液電阻 (Ω)

CPE-T: 電極表面電容 (mF)

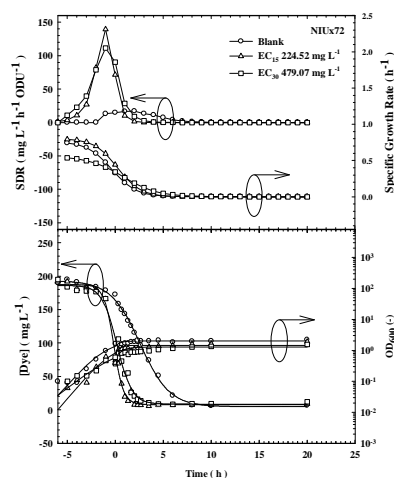
R_{ct}: 電極表面電阻/電荷轉移電阻 (Ω)

W_s-R: Warburg 阻抗元件電阻 (Ω)

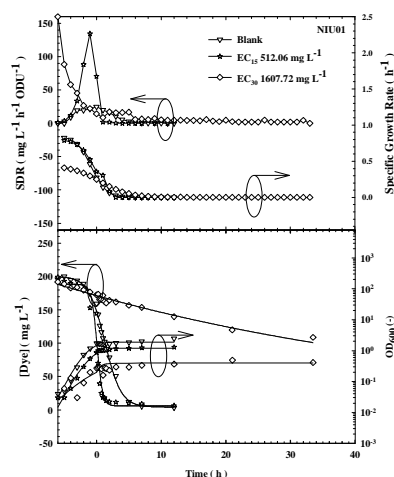
3.3 搖瓶脫色

既然先前研究論及產電及生物脫色兩者同樣涉及電子轉移之作用，因此2AP若可有效刺激產電，相對地亦應具有提高脫色效能之能力。藉由搖瓶脫色過程中添加2AP，來瞭解處理染整廢水產出芳香胺中間物可能對染整廢水微生物處理之影響(圖七、八)，比較發現兩組微生物NIUx70、NIU01添加低劑量響應濃度EC₁₅條件下2AP皆明顯刺激、以促進脫色之作用，比脫色速率(SDR)皆明顯提高，最大比脫色速率(單位mg L⁻¹h⁻¹ODU⁻¹)NIUx72 (Blank) 16.95增加至NIUx72 (EC₁₅) 139.42，NIU01 (Blank) 24.94增加至EC₁₅ 134.41，但在較高劑量響應濃度EC₃₀之2AP下NIUx72最大比脫色速率由NIUx72 (EC₁₅) 139.4降至NIUx72 (EC₃₀) 111.4，而純菌NIU01會因毒性作用而造成生長速率(SGR)更顯著下降，進而嚴重影響脫色速率，使得原本在無添加條件下靜置十小時雖可達到95%之脫色率，但在添加後至十

小時仍達不到除色率25%，更可驗證控制在低生物毒性之中間物在微生物處理染整廢水之影響極為重要。



圖七: IUx72 混菌對染料RBu160 起始濃度約 200mg L⁻¹ 下相對生長及脫色曲線比較。



圖八: NIU01 純菌對染料RBu160 起始濃度約 200 mg L⁻¹ 下相對生長及脫色曲線比較。

4 結論

模式芳香胺中間物 2AP，在低劑量濃度下，加入 MFC 中不僅可顯著刺激產電能力，亦具有加速脫色處理之效果，亦能明顯降低電池內阻，在高濃度下由於生物毒性之影響，兩種效能皆有明顯下降。因此如何利用低毒性之外源性氧化還原介質作為電子梭，提高電子傳遞作用是 MFCs 中之一大關鍵。換言之，微生物燃料電池之所以異於一般燃料電池，主要在受限於槽體中化學成分本身之生物毒性，而致使電子傳遞作用無法有效發揮，因此如何克服此點將是最大之關鍵所在。

誌謝

感謝國科會(NSC 98-2221-E-197-007-MY3)經費補助。

文獻

- [1] B.-Y. Chen, M.-M. Zhang, Y. Ding, and C.-T. Chang, "Feasibility study of simultaneous bioelectricity generation and dye decolorization using naturally occurring decolorizers," *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, vol. 41, pp. 682-688, 2010.
- [2] B.-Y. Chen, Y.-M. Wang, and I. S. Ng, "Understanding interactive characteristics of bioelectricity generation and reductive decolorization using *Proteus hauseri*," *Bioresource Technology*, vol. 102, pp. 1159-1165, 2011..
- [3] B.-Y. Chen, M.-M. Zhang, C.-T. Chang, Y. Ding, K.-L. Lin, C.-S. Chiou, C.-C. Hsueh, and H. Xu, "Assessment upon azo dye decolorization and bioelectricity generation by *Proteus hauseri*," *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 4737-4741, 2010.
- [4] C.-C. Hsueh, B.-Y. Chen, and C.-Y. Yen, "Understanding effects of chemical structure on azo dye decolorization characteristics by *Aeromonas hydrophila*," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 167, pp. 995-1001, 2009.
- [5] B.-Y. Chen, Y.-M. Wang, I. S. Ng, S.-Q. Liu, and J.-Y. Hung, "Deciphering simultaneous bioelectricity generation and dye decolorization using *Proteus hauseri*," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 113, pp. 502-507, 2012.
- [6] L. Liu, F.-b. Li, C.-h. Feng, and X.-z. Li, "Microbial fuel cell with an azo-dye-feeding cathode," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 85, pp. 175-183, 2009.
- [7] B. E. Logan and J. M. Regan, "Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells," *Trends in Microbiology*, vol. 14, pp. 512-518, 2006.
- [8] K. Xiang, Y. Qiao, C. B. Ching, and C. M. Li, "GldA overexpressing-engineered *E. coli* as superior electrocatalyst for microbial fuel cells," *Electrochemistry Communications*, vol. 11, pp. 1593-1595, 2009.
- [9] B.-Y. Chen, Y.-M. Wang, and I. S. Ng, "Understanding interactive characteristics of bioelectricity generation and reductive decolorization using *Proteus hauseri*," *Bioresource Technology*, vol. 102, pp. 1159-1165, 2011.
- [10] M.-M. Zhang, W.-M. Chen, B.-Y. Chen, C.-T. Chang, C.-C. Hsueh, Y. Ding, K.-L. Lin, and H. Xu, "Comparative study on characteristics of azo dye decolorization by indigenous decolorizers," *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 2651-2656, 2010.
- [11] A. A. Ensafi, E. Khoddami, B. Rezaei, and H. Karimi-Maleh, "p-Aminophenol–multiwall carbon nanotubes–TiO₂ electrode as a sensor for simultaneous determination of penicillamine and uric acid," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 81, pp. 42-49, 2010.
- [12] B.-Y. Chen, H.-L. Liu, Y.-W. Chen, and Y.-C. Cheng, "Dose–response assessment of metal toxicity upon indigenous *Thiobacillus thiooxidans* BC1," *Process Biochemistry*, vol. 39, pp. 737-748, 2004.
- [13] P. Aelterman, S. Freguia, J. Keller, W. Verstraete, and K. Rabaey, "The anode potential regulates bacterial activity in microbial fuel cells," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 78, pp. 409-418, 2008.
- [14] H. Liu and B. E. Logan, "Electricity Generation Using an Air-Cathode Single Chamber Microbial Fuel Cell in the Presence and Absence of a Proton Exchange Membrane," *Environmental Science & Technology*, vol. 38, pp. 4040-4046, 2004/07/01 2004.
- [15] Y. Sharma and B. Li, "The variation of power generation with organic substrates in single-chamber microbial fuel cells (SCMFCs)," *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 1844-1850, 2010.
- [16] Allen J. Bard, Larry R. Faulkner, "Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, 2nd Edition" *John Wiley and Sons*, 2000.
- [17] I. Ieropoulos, J. Winfield, and J. Greenman, "Effects of flow-rate, inoculum and time on the internal resistance of microbial fuel cells," *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 3520-3525, 2010.
- [18] V. J. Watson and B. E. Logan, "Analysis of polarization methods for elimination of power overshoot in microbial fuel cells," *Electrochemistry Communications*, vol. 13, pp. 54-56, 2011.
- [28] B.-Y. Chen, W.-M. Chen, F.-L. Wu, P.-K. Chen, and C.-Y. Yen, "Revealing azo-dye decolorization of indigenous *Aeromonas hydrophila* from fountain spring in Northeast Taiwan," *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, vol. 39, pp. 495-501, 2008.