

應用濁度測定法於土壤微生物 *Pseudomonas fluorescens* 對飽和水力傳導度影響之研究

林俐玲⁽¹⁾ 杜怡德⁽²⁾ 蔡義誌⁽²⁾

摘 要

本研究目的在瞭解吸光法應用於量測微生物 *Pseudomonas fluorescens* 生長所產生孔隙阻塞，造成水力傳導度降低之可行性。研究中以石英砂來模擬土體在飽和狀況下飽和水力傳導度（Ks 值）之變化，為此進行微生物影響飽和水力傳導度實驗及純水對照實驗，並以抬升水頭及加入殺菌劑等不同處理觀察對飽和水力傳導度的影響。結果顯示吸光法可適用於微生物對飽和水力傳導度影響之研究，不失為一簡單可行又具相當準確度之方法。

(關鍵字：Pseudomonas fluorescens、飽和水力傳導度、生物性阻塞)

Assessing the Effect of *Pseudomonas Fluorescens* on Saturated Hydraulic Conductivity with Turbidity Method

Li-Ling Lin⁽¹⁾, Yi-Te Tu⁽²⁾, Yi-Zhih Tsai⁽²⁾

Professor and Chairperson, Ph.D Graduated Students, Department of Soil and Water Conservation, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan 402, R.O.C.

ABSTRACT

This study is focused on the usability of using Turbidity Method in assessing the effect of microorganisms clog pores (Bioclogging) on soil saturated hydraulic conductivity (Ks value) with the sand column. Adding *Pseudomonas fluorescens* or water (controlled experiment) into the sand column with full nutrition were conducted with three conditions: elevated hydraulic head 3 cm, elevated hydraulic head 2 cm and add sodium azide, NaN_3 , a strong biocide.

(1) 國立中興大學水土保持學系教授兼系主任

(2) 國立中興大學水土保持學系博士研究生

The results showed that, *Pseudomonas fluorescens* caused decrease in the saturated hydraulic conductivity. It suggests that the Turbidity Method may be a good method to assess the growth of *Pseudomonas fluorescens* as related to the decreased saturated hydraulic conductivity.

(Key words: *Pseudomonas fluorescens*, Turbidity Method, Saturated hydraulic conductivity)

一、前言

土壤飽和水力傳導度影響地表逕流產生、水庫蓄儲及地下水水位高低等，扮演著自然界水循環中不可或缺的一環。亦與地表植生、農作物耕種、土壤中農藥及重金屬污染等現象息息相關。

近年來有學者如 Baveye, P & Valocchi, A (1989)、Chunningham et al., (1991)、Miyazaki, T (1993)、Chapelle (1993)、Sanchez et al., (1994)、Vandevivere and Baveye (1995)、Seki et al (1996) 指出生物性阻塞土壤孔隙也為造成土壤飽和水力傳導度下降的原因。

一般常用量測微生物數量的方法有平板計數法 (Plate Counts)、直接顯微鏡測數法：(direct count) 最確數計算法：(the most probable number, MPN) 而、濁度測定：(Turbidity) (鍾楊聰 et al, 2002) 總有機碳 TOC 測定法 (Total Organic Carbon) (魏裕庭, 1992)、電導測量技術 (Conductimetry Mehtod) (Felice et al, 1999) 等。而已應用在量測生物性阻塞孔隙造成飽和水力傳導度下降的方法有平板計數法 (Seki et al, 1996)、直接顯微鏡測數法 (Chunningham et al, 1991) 等，但這些方法有些需時較久準確度亦不高，或準確但花費高且不易運用於現地實驗等問題存在。

為此本研究擬應用一般常用於微生物數量測定上的濁度測定法來測試造成生物

性阻塞導致土壤飽和水力傳導度下降現象中微生物中的數量之可行性。

二、研究材料方法與理論

本研究主要目的在控制條件下應用土壤常見菌種進行土柱飽和水力傳導度實驗，探討濁度測定法在測定微生物對土壤飽和水力傳導度影響之可行性，以明瞭微生物之生長對土壤最終飽和水力傳導度之影響。

1. 研究理論

1.1 濁度測定法 (Skoog et al, 1998)

濁度測定法所應用的原理為應用分光儀 (spectrophotometer) 依一定波長 (600nm)，先測量同菌種不同濃度菌液，測其吸光值 (Optical Density, 以下簡稱 OD 值)，率定出標準曲線後。再量測未知溶液吸光值，並依標準曲線推算同菌種未知濃度菌液，來對照出未知菌液所含菌數。這是較為快速而方便的計數細菌的方法 (含死、活菌)。

此種方法相較於一般量測造成生物阻塞孔隙問題中微生物數量的方法如平板計數法、直接顯微鏡測數法有著以下幾點優點：1. 儀器花費少 (只需分光儀)，2. 實際檢驗時間短 (只需測出流出溶液之 OD 值，再對照標準曲線即可得知該溶液所含的微生物數量)，3. 應用範圍較廣，平板計數法會受微生物種類之影響須換不同培養基進行培養，或是直接顯微鏡測數法在黴菌數量的測定上會因黴菌會有菌絲產生而造成誤差。4.

所測得的微生物數量為微生物總數量(包含微生物已死亡之菌體)，這對於量測生物性阻塞孔隙造成飽和水力傳導度下降的問題上特別重要，因為會造成阻塞孔隙問題主因之一是微生物總數量上的增加(不論死活)。而平板計數法只能測得活菌數量，在需長時間測定微生物總數量時會造成相當大的誤差。

分光儀所應用之原理為 Beer's law 敘述如下：

對單色光輻射(單一波長的光源)而言，吸光值 A 正比於介質(溶液)中的光徑長度 b 與欲分析物質的濃度 c 。

$$A = a \times b \times c \quad (1)$$

A ：吸光值

b ：光徑長度，單位為 cm

c ：欲分析物質濃度 若濃度以 g/L 表示 則 a 稱為吸收係數 (absorptivity)，單位為 $\text{L g}^{-1}\text{cm}^{-1}$

在一定濃度範圍內 吸光值 A 與物種濃度成正比。故以儀器測出吸光值之後，可以根據標準曲線，換算出物種濃度。

1.2 達西定律(Darcy's Law) (Darcy, H, 1856)

Darcy 定律假設土壤(土柱)內水分流動為穩定流(steady flow)，水流方向為一維流動(one-dimensional flow)，其形式如下：

$$q = K(\Delta H/L)$$

(2)

式中：

q ：比流出率，或稱為流束密度 (LT^{-1})， $q = Q/A = V/AT$ 。

K ：水力傳導度(LT^{-1})。

$\Delta H/L$ ：流體推進力，即水力梯度。

Q ：單位時間通過之水分體積(L^3T^{-1})。

A ：截面積(L^2)

V ：水分體積(L^3)。

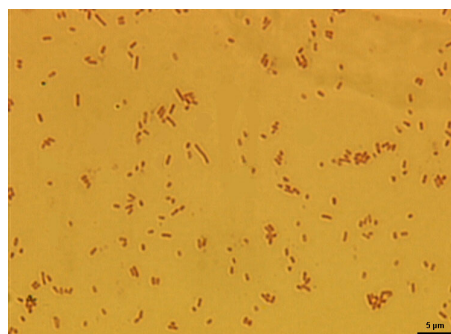
T ：單位時間(T)。

由於 Darcy 定律僅假設為穩定流況，不適用於紊流狀態，在不受外力作用下，土壤中水分移動多以層流形態來呈現，故 Darcy 定律可應用於本研究。

2. 研究材料

2.1 實驗菌種：

為探討土壤微生物對飽和水力傳導度之影響，故應用在已耕種或未耕種土地中，普遍存在且佔很大的優勢的 *Pseudomonas* 菌株中之 *Pseudomonas fluorescens* (IAM 12022T= ATCC 13525)，此實驗菌種購自日本東京大學菌種保存中心(Institute of Applied Microbiology Culture Collection, IAMCC)，其生理及代謝情形為一般普遍所知。來作為此次研究對象。



照片 1. *Pseudomonas fluorescens* 於顯微鏡下之型態

Picture 1. The microscopy of *Pseudomonas fluorescens*

2.2 供試土柱：

本研究實驗用石英砂柱使用內徑 8.0cm 長 15cm 厚度 1.0cm 以透明壓克力製成之土柱，配合可拆卸式上下蓋，內裝填通過 # 100 ~ 140 號石英砂至分層夯實至土柱總體密度 $1.50 (\text{g}/\text{cm}^3)$ 。

2.3. 實驗藥品：

為瞭解土壤中微生物對飽和水力傳導度之影響，以供應充足營養源方式來模擬觀察微生物對飽和水力傳導度之影響方式進行 *Pseudomonas fluorescens* 土柱飽和水力傳導度實驗，供試溶液有以下兩種：

1. 以 Nutrient agar(Difco0001) 8g/L、Glucose 10g (1%)、Plenol Red 2ml/L (石碳酸紅 0.2%，識別用指示劑)調成之營養液經滅菌後來供給微生物生長所需之充足營養源。

2. 採用純水經滅菌後，供對照組實驗所需。

2.4. 實驗條件：

實驗環境保持為恆溫 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (閔勝寿 et al., 2005)，濕度 50%，實驗均於無光源之環境進行，如此可防止藻類生長，避免藻類的生物性阻塞(Ragusa et al., 1994)。

3. 實驗流程：

3.1. 實驗儀器準備

(1) 前處理及飽和過程

將石英砂分別過 # 100~140 乾篩機與濕篩機後，再經高溫 200°C 滅菌三小時。於無菌環境中裝填入以預先滅菌之土柱容器中，分層震動搗實至土柱總體密度為 $1.5(\text{g}/\text{cm}^3)$ ，土柱之各出口置入 # 325 號篩網防止石英砂漏出。

將土柱置於室溫 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 之無菌環境下進行土柱預飽和後，再以抽氣裝置抽氣至土柱飽和。

(2) 實驗過程

為避免光線之影響，實驗裝置全程以黑色乙稀樹脂布蒙上，將實驗用土柱，注射入培養至最佳生長狀況之菌液 5ml，在室溫 25°C 無菌環境中進行土柱飽和水力傳導度實驗，將定水頭裝置設定起始水頭高度 3cm，出口處

之流量則以定時溶液收集器收集保存於 10°C 之低溫下(使菌種生長及新陳代謝速度趨慢以減低實驗誤差)，待日後量測流出液中之 O.D 值及出流量，轉換成細菌生成量來計算微生物(細菌)對土柱水力傳導度之影響，並加入指示劑以瞭解細菌於土柱溶液中之生長情形。觀察時間約兩週。

3.2. 實驗菌種準備

以購自日本東京大學菌種保存中心(Institute of Applied Microbiology Culture Collection, IAMCC)乾燥真空保存菌種管經活化過程後，置於 $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恆溫生長裝置中連續培養 12 小時以上再置入含有無菌培養液之容器中，置於 $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恆溫生長裝置中培養 1~3 天，重複 1~3 次以達實驗時之最佳生長狀況。

3.3. 標準曲線率定實驗

應用濁度測定法將分光儀設定在波長 600nm 處測量其吸光值(OD 值)，以滅菌後培養液來供給微生物生長所需，將經兩次活化後達到最佳生長狀況之微生物接種入培養液中，起始種菌接種量為 5%，培養 16 小時取出，其最初 OD 值為 1.5608。再將其連續稀釋，以分光儀分別測量連續稀釋成不同濃度菌液之 O.D 值後，將不同 O.D 值之菌液以平板計數法(spread plate method)計算各試管之菌數，以率訂出微生物菌數與以分光儀測得之 O.D 值關係之標準曲線如圖 1。

三、結果與討論

為瞭解細菌土壤水力傳導度之影響，試以純水實驗及加入純菌種 *Pseudomonas fluorescens* 進行飽和水力傳導度實驗，應用，濁度測定法測定 OD 值與飽和水力傳

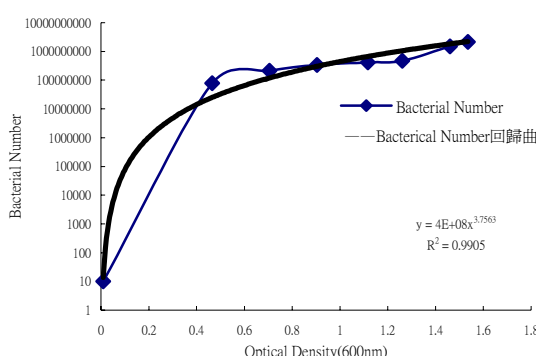


圖 1. OD 值與微生物菌數對照圖

Figure 1. The Relation of Bacterial number and OD Value

導度下降之關係，並以抬升水頭及加入殺菌劑等不同處理來闡明細菌生長及新成代謝過程對土壤水分滲透之影響。

純水飽和水力傳導度土柱實驗全程在室溫 25°C，無菌環境下進行兩週，實驗進行兩週間測定飽和水力傳導度繪如圖 2。

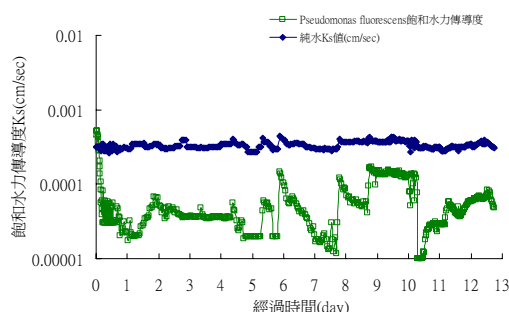


圖 2. 純水與 Pseudomonas fluorescens 實驗飽和水力傳導度與時間關係圖

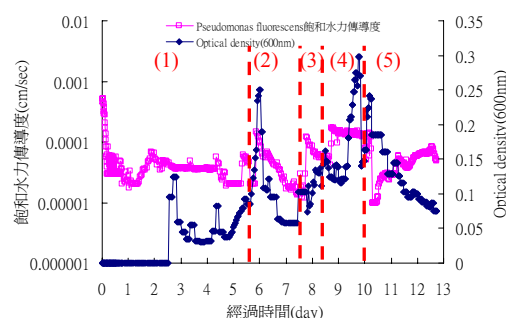
Figure 2. The Saturated hydraulic conductivity for Water and Pseudomonas fluorescens experiments.

由圖 2 可知在開始實驗後至兩週間，水力傳導度略有升降，上下波動不大，推測為因日夜交替，大氣壓力變化所造成的波動現象。

Pseudomonas fluorescens 飽和水力傳導度實驗亦於室溫 25°C，無菌操作台中無菌環境下將經前處理及飽和過程之土柱注射已培養 2~3 天生長最旺盛時之

Pseudomonas fluorescens 菌液 5ml 進行實驗，將 Pseudomonas fluorescens 實驗兩週間水力傳導度之變化繪於圖 2，開始之初始飽和水力傳導度如圖 2 所示約為

0.0009cm/sec，由圖 2 可知含 Pseudomonas fluorescens 實驗其飽和水力傳導度在實驗開始後的兩週間比純水實驗約有 $10^1 \sim 10^2$ 次方降低。



註：(1)正常流況(2)抬升水頭 3cm(3)抬升水頭 2cm(4)加入滅菌劑 $\text{NaNO}_2 200 \mu\text{g cm}^{-3}$ (5)缺水 2.5 小時後再添加水量

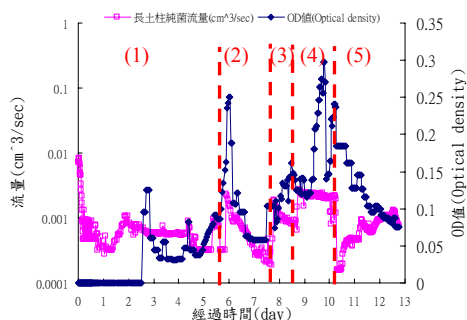
圖 3. Pseudomonas fluorescens 實驗飽和水力傳導度、OD 值與時間關係圖

Figure 3. Relation of Saturated hydraulic conductivity and Optical density for Pseudomonas fluorescens experiment.

將 Pseudomonas fluorescens 實驗兩週間飽和水力傳導度、流量與測得微生物 OD 值之變化繪於圖 3、圖 4，將實驗不同時間間有不同處理約略分為(1)~(5)個階段。

第(1)階段為開始至 5.86 天，由實驗中觀察到在(1)階段期間，飽和水力傳導度於 6~7 小時後則快速下降，其後則在不同時間間略有升降。此現象可能為實驗土柱封入

空氣的溶解，而後定量的營養液溶入定量的空氣達平衡的過程（關勝壽，1998）。之後則因細菌通過土柱，造成土柱中水分流通孔隙阻塞。形成飽和水力傳導度之下降。



註：(1)正常流況(2)抬升水頭 3cm(3)抬升水頭 2cm(4)加入滅菌劑 $\text{NaNO}_3 200 \mu\text{g cm}^{-3}$ (5)缺水 2.5 小時後再添加水量

圖 4. *Pseudomonas fluorescens* 實驗飽和水力傳導度、OD 值與時間關係圖

Figure 4. Relation of Saturated hydraulic conductivity and Optical density for *Pseudomonas fluorescens* experiment.

第(2)階段 5.86~7.78 天，以抬升水頭 3cm 處理，於此階段可觀察到因提升水頭而導致飽和水力傳導度上升，同時 O.D 值也因提升水頭而有較高之測值。

第(3)階段 7.78~8.72 天，以抬升水頭 2cm 處理，可觀察到於 7.78 天亦因抬升水頭造成飽和水力傳導度的上升，但 O.D 值因抬升水頭幅度較小故上升較不明顯。

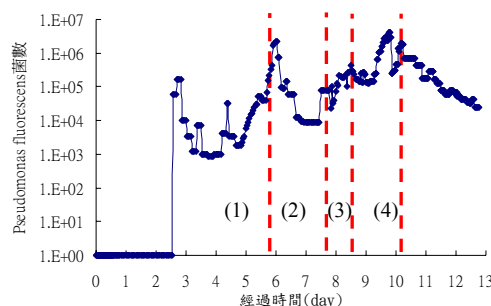
第(4)階段 8.72~10.4 天以加入滅菌劑 $\text{NaNO}_3 200 \mu\text{g cm}^{-3}$ 處理，可觀察到因加入殺菌劑其飽和水力傳導度與 OD 值皆有明顯上升。

第(5)階段 10.4~12.8 天，於 10.4 天時定水頭裝置發生供試液體流光之現象造成營養液供應中斷約 0.2 天，故飽和水力傳導度於 10.4 天時下降，而在添加水量後又有

緩步上升趨勢，但於因而在 11.2 天左右再添加水量至定水頭裝置造成實驗之誤差，故於 12.8 天時中止實驗。

觀察圖 3 及圖 4 在 *Pseudomonas fluorescens* 實驗中微生物 OD 值有偏小現象，此乃因為收集流量之方式是以 1 公尺長滅菌矽膠管連接土柱與置入冰箱中之定時溶液收集器，導致出流菌液中之菌體於管中沈澱，造成收集到之 O.D 值偏小之實驗誤差。

將收集所得之微生物 OD 值對照圖 1 得出 *Pseudomonas fluorescens* 菌數繪於圖 5。



註：(1)正常流況(2)抬升水頭 3cm(3)抬升水頭 2cm(4)加入滅菌劑 $\text{NaNO}_3 200 \mu\text{g cm}^{-3}$ (5)缺水 2.5 小時後再添加水量

圖 5. *Pseudomonas fluorescens* 生長菌量與時間關係圖

Fig.5 The Relation diagram between the number of *Pseudomonas fluorescens* and time.

由圖 5 得知 OD 值於 2.5 天後開始上升，推測此乃因 *Pseudomonas fluorescens* 增生需要時間，且供試土柱較長，需較長時間方能於出流端收集到含菌溶液。

觀察圖 4 之第(2)~(3)階段，可知抬升水頭會造成流量變大，亦使流出土柱溶液中含較多菌量。比較第(2)階段及(3)階段之流量可知抬升高度越高，流量越大，但因為抬升水頭為物理性效應，故所測得之微生物 OD

值並未明顯增大。

由圖 4 觀察到第(4)階段流量及微生物 OD 值皆有增加，推測可能因滅菌劑 NaNO_3 發生作用，導致 *Pseudomonas fluorescens* 被殺死後其菌體隨溶液不斷流出，造成出流液中含菌量增加現象。而觀察此階段流量變化情形並不像第(2)~(3)階段有明顯上升後下降趨勢。

將 *Pseudomonas fluorescens* 實驗中三種處理與該時期累積流量比繪如圖 6，由圖 6 中可知，加入殺菌劑後其為化學及生物性永久破壞，亦使飽和水力傳導度未隨時間大幅遞減。此點於抬升水頭之物理作用產生其飽和水力傳導度改變會隨時間下降有所不同，但由圖 4、圖 5 可知無論是抬升水頭或是添加殺菌劑等處理皆無法使土柱之飽和水力傳導度恢復至原有土柱之飽和水力傳導度。

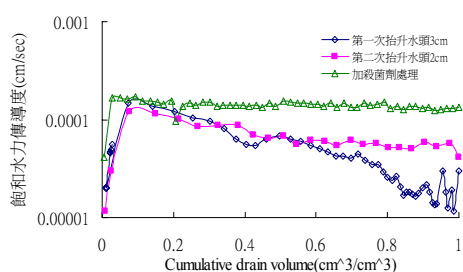


圖 6. 各處理之飽和水力傳導度與累積流量比關係圖

Fig.6 The Relation diagram between Saturated hydraulic conductivity and Cumulative drain volume for three treatments.

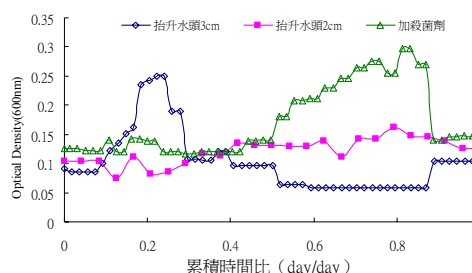


圖 7. 各處理之 OD 值與累積時間比關係圖

Figure 7. The Relation diagram between Saturated hydraulic conductivity and Cumulative time ratio for three treatments.

將 *Pseudomonas fluorescens* 實驗中三種處理之 OD 值與該累積時間比繪如圖 7，由圖 7 可知抬升水頭 3cm 之處理比抬升水頭 2cm 其 OD 值變化較明顯。但抬升水頭處理至一定時間後其 O.D 值漸呈定值，比較圖 4、圖 7 可知抬升水頭處理並不會對 O.D 值造成較大改變，三種處理中以殺菌劑處理其 OD 值變化最大，亦可驗證前述圖 6 所觀察到的現象。

此外在 *Pseudomonas fluorescens* 實驗中亦可觀察到在收集流出量時，流出菌液中常有氣泡伴隨流出。推測為微生物在增生過程中，會因呼吸及新陳代謝等作用產生如 CO_2 或是 CH_4 等氣體，而造成水分流通空隙之阻塞。關於此論點宮崎毅(2000)指出之微生物產氣現象亦會造成土柱水力傳導度之降低，但本研究並無法量化其影響。

四、結論

歸結整個研究的內容，大致上可將其分為以下五點結論：

1. 比較純水實驗與 *Pseudomonas fluorescens* 實驗得知在實驗的兩週間飽和水力傳導

度純水實驗略有升降，但並未像

Pseudomonas fluorescens 實驗中的飽和水力傳導度有 $10^1 \sim 10^2$ 次方降低，顯示微生物的確會對飽和水力傳導度造成影響。

2. 藉由量測實驗期間出流溶液之吸光值 (O.D 值)，應用標準曲線得到對照微生物之生長量，來與出流量比較可知微生物的生長數量會對土柱水力傳導度造成一定之影響。
3. 本研究應用濁度測定法來測量 *Pseudomonas fluorescens* 對飽和水力傳導度之影響，由前述討論及圖 3、圖 4 之結果得知應用此方法於量測微生物對飽和水力傳導度可得致良好成果。
4. 由 *Pseudomonas fluorescens* 實驗中三種不同處理結果得知抬升水頭會造成物理性的短暫改變流量，而添加殺菌劑則會造成不可逆的流量變化，但都無法使土柱恢復原有飽和水力傳度。
5. *Pseudomonas fluorescens* 實驗收集到之 OD 值偏小但仍與所觀測到水力傳導度有良好對應，建議如欲進行此類實驗時若能改進收集流量儀器如電子天平，並縮短出流管長以減少微生物於管中沈澱，將會有更佳之結果。

五、參考文獻

1. 魏裕庭(1992)地下水生物復育中基質對微生物分佈之研究，國立台灣大學環境工程學系研究所碩士論文
2. 鍾楊聰、方繼、許元勳、陳啓楨、林建谷、林春福、巢家莉 (2002) 基礎微生物學偉明圖書公司出版，p162~163。
3. Baveye, P and Valocchi, A (1989) An evaluation of mathematical models of the transport of biologically reacting solutes in saturated soils and aquifers. *Water Resour Res* 25:1413-1421
4. Chapelle, F. H. (1993). *Ground-Water Microbiology & Geochemistry*. John Wiley & Son, New York, NY, USA
5. Cunningham, A. B., Characklis, W.G., Abedeen, F. and Crawford, D. (1991) Influence of Biofilm Accumulation on Porous Media Hydrodynamics. *Environmental Science & Technology* (25):1305-1311.
6. D. A. Skoog, et al (1998), "Principles of Instrumental Analysis", 5th Ed., Saunders College Pub, New York.
7. Darcy, H (1856). "Les Fontaines Publiques de la ville de Dijon" Dalmont, Paris.
8. Felice, C. J. and Madrid, R. E. (1999) Impedance microbiology: quantification of bacterial content in milk by means of capacitance growth curves. *Journal of Microbiological Methods*, 35:37-42.
9. Miyazaki, T (1993) "Water flow in soils" Marcel Decker Inc, New York.
10. Ragusa, S.R., de Zoysa, D.S. & Rengasamy, P. (1994) The effect of microorganisms, salinity and turbidity on hydraulic conductivity of irrigation channel soil. *Irrigation Science* 15, 159-166.
11. Sanchez de Lozada, Vandivivere, P., P. Baveye and Zinder, S (1994) Decrease of the hydraulic conductivity of sand columns by *Methanosarcina barkeri*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (10):325-333.
12. Seki, K., Kamiya, J., and Miyazaki, T. (2005) Temperature dependence of hydraulic conductivity decrease due to biological clogging under ponded infiltration. *Trans. Jpn. Soc. Irrig. Drain. Reclam. Eng.*, 237 : 13-19.

13. Seki, K., T. Miyazaki and M. Nakano(1996) Reduction of hydraulic conductivity due to microbial effect. Trans. Jpn. Soc. Irrig. Drain. Reclam. Eng., 181:137-144.
14. Seki, K., T. Miyazaki and M. Nakano(1998) Effect of microorganisms on hydraulic conductivity decrease in infiltration. European Journal of Soil Science.,49:231-236.
15. Vandivivere, P.,P. Bavaye, D.Sanchez de Lozada, and P. DeLeo (1995) Microbial clogging of saturated soils and aquifer materials :Evaluation of mathematical models. Water Resources Reseach 31(9) :2173-2180.

95 年 12 月 12 日 收稿

96 年 1 月 5 日 修改

96 年 1 月 11 日 接受