

大礁溪實驗林場木棲性細菌之初探

林亞立¹ 王俐云²

1. 國立宜蘭技術學院森林系教授
2. 國立宜蘭技術學院森林系二技畢業生

摘要

為了解大礁溪實驗林場杉木設施木棲性細菌之類別與對木材可能的影響，於標本園中杉木設施取樣，分離純化得10支菌株（編號C1~C10），另於標本園中所設置的小徑木試樣，分離得7支菌株（編號D1~D7）。經纖維素分解力測定，篩選出7支菌株（C1、C2、C3、C4、D2、D6、D7）進行後續試驗。菌株經由革蘭氏染色結果，所篩選出的7支菌株皆為陽性桿菌。對此7支菌株進行木材降解能力試驗，發現細菌對木材確實具有降解能力，但試材重量損失百分比僅在1.20~1.80 %之間，就木生微生物（wood-inhabiting microorganisms）對木材降解能力而言，細菌對木材降解程度並不嚴重。在菌株對木材細胞壁降解型態方面，細菌的酵素系統對木材細胞壁的降解方式，與白腐菌類似，即由細胞腔自S₃、S₂至S₁層逐步向外侵蝕。細菌對不同木材細胞的降解模式並無一定，如對縱向管胞之侵害有自細胞腔向外逐步侵蝕，或由細胞壁開始逐步向內侵蝕，使細胞與細胞間產生剝離的現象，或於細胞壁上形成整齊的侵蝕溝。對於木質線薄壁細胞的降解，則呈現不規則狀。形成不同侵蝕型態的結果，可能與其分泌之酵素不具滲透性有關，因此細胞壁之破壞僅發生於與菌落相鄰之處。

關鍵詞：大礁溪實驗林場、木棲性細菌

A Primary Survey on the Wood-Inhabiting Bacteria Collected from the Experimental Forest of the National I-Lan Institute of Technology

Ya-Lin Lin¹ and Li-Yun Wang²

1. Professor Department of Forestry , National I-lan Institute of Technology

2. Alumnus, Department of Forestry , National I-lan Institute of Technology

Abstract

In order to understand the characteristics and wood degradation properties of wood inhabiting bacteria from the wood of *Cunninghamia lanceolata* var. *lanceolata* in the experimental forest, wood samples were collected from wooden structures and small diameter logs, 10 (No.C1-C10) and 7 (No.D1-D7) bacterial strains were isolated and purified from these two types of samples separately. A cellulose degradation ability test was carried on these 17 stains to screen out the 7 stains which possessed obvious cellulose degradation ability for the following tests. From Gram's stain and microscopic observation, all the 7 strains were revealed to be Gram positive rods. Results from the wood-agar test indicated that all the strains can degrade wood cell walls, however, the percentage of weight losses were mild, ranged from 1.20 to 1.80%. From the microscope observation of the bacterial incubated wood specimens, the degradation pattern of these bacterial strains was categorized as the erosion type. The enzyme secreted from the bacteria did not penetrate, which rendered the cell wall erosion area confined to the region where the bacteria presented. Therefore, the erosion areas discovered were on the cell lumen, the cell corner, wood rays, and pits, which coincided with the motivation passages of the bacteria in wood. The destruction may include the erosion from S₃ to S₂ and S₁ layers, the separation of adjacent cells caused by the decomposition of the cell corner, the erosion of the ray cells, and the desrupture of the pit structure.

Key Words : Experimental Forest, wood-inhabiting bacteria

一、前言

木材暴露在戶外與土壤及水接觸後，因含水率的提高極易遭木棲性微生物（wood-inhabiting microbes）的侵入與滋生，而導致木材劣化與降解。木棲性微生物在木材的微環境中亦呈現著消長與演替的現象，通常細菌（bacteria）為最早侵入木材的微生物，其次才是各種類型之真菌（fungi）。在演替的過程中各種微生物經由競爭與合作的交互關係，將木材分解，使養分回歸循環。【1、2】一般認為細菌並不會造成木材組織之降解，反而會因部分細菌之固氮及破壞壁孔結構等作用，而有利於真正具有木材組織降解功能的真菌（通稱木材腐朽菌，wood decay fungi）對木材進行分解。【3】然而有報告指出，【4、5、6、7、8】沈於水中或高含水率的木材其細胞壁會遭細菌分解。Zabel and Morrell【9】依 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 之分類歸納了其中第 2、7、8、15 及 17 部分之細菌對木材具有降解能力。Greaves【10】於實驗室中對 20 種細菌進行測試，結果顯示雖然降解速率低（相對於腐朽菌）但試驗的菌株皆能對木材細胞壁產生降解。Eaton and Johnston【11】及 Nilsson【12】則發現經鉻化磷酸銅防腐劑處理之木材雖能防止木材腐朽菌之侵害，但卻無法抑制木棲性細菌的滋生與降解。由此可知，部分的木棲性細菌的確能對木生的細胞壁產生降解。

不同的細菌菌株對木材細胞壁降解方式並不相同。Eaton and Dickinson【13】首先觀察到木棲性細菌在木材二次細胞壁的 S₂ 層中形成孔道（tunnels）。Nilsson and Singh【14】及 Daniel and Nilsson【15】則分別指出木棲細菌可由 S₃ 侵入 S₂ 壁層，並於其中形成孔穴（cavitation）及於 S₃ 層形成侵蝕溝逐步侵蝕（erosion）細胞壁。由此可知，細菌對木材細胞壁的降解形式可分為孔道、孔穴及侵蝕等三種類型。

本試驗以大礁溪實驗林場杉木木造設施為對象，探討由其中所發現之木棲性細菌的基本型態與性質，以做為了解及認識木材細菌性劣化的開始。

二、材料與方法

（一）樣本之採集

1. 樣本採取

於大礁溪實驗林場標本園入口至標本園間之杉木（*Cunninghamia lanceolata* var. *lanceolata*）階梯上採取樣本，共取十一個樣本。

2. 設置杉木樣本

在標本園標本採集點及忠信樓周邊鄰近之樹木上及地面分別放置一支帶皮之杉木小徑木（直徑約 5 公分，長 15 公分）。於樣本採取時設置，一個月後收回。

（二）菌株之培養

1. 初步菌株培養

將採回之杉木階梯樣本及杉木小徑木，截取適當位置，以徒手切片切成小片，分別置入盛有無菌水之小瓶中，用力搖晃將菌體自試片中分離。吸取 2-3ml 菌液接於麥芽抽出物培養基（1% malt extract, 0.05% yeast extract, 2% agar powder）上。另外，將徒手切片所切成之小試片，直接接於麥芽抽出物培養基上，置於恆溫（27℃）培養箱中，培養 1 週。

2. 吸附聚積培養

選取經初步菌株培養 1 週後之細菌菌落，以玻璃棒沾取，置入盛有 10ml 纖維素培養液（0.5% cellulose powder, 0.01% yeast extract）之試管中，再將試管中之菌液倒入盛有 40ml 纖維素培養液之三角錐瓶中，以適當大小之鋁箔封口，置於振盪培養器，培養 1 週後離心。具分解纖維素能力之菌株會隨纖維素沉降於培養液下半，吸附在纖維素之表面。

3. 分離純化

以玻璃吸管吸取離心液下層纖維素懸浮液 1ml 滴入纖維素培養基（0.5% cellulose powder, 0.01% yeast extract, 2% agar powder），以藥匙推勻，使之平均覆蓋於培養基表面，置於恆溫（27℃）培養箱中，培養 1 週後，將培養基表面菌落以劃線法在纖維素培養基上反覆操作培養，分離出純化菌株。

（三）纖維素分解力測定

將純化菌株加無菌水製成懸浮液（約 1×10^7 個/ml），取 1ml 懸浮液加入裝有 15ml 0.5% cellulose powder 的三角錐瓶中，三個重覆，在室溫下振盪培養 10 天。將培養液離心後，取 1ml 上層澄清液，以恩酮試劑顯色，在光電比色計測定糖濃度，了解各菌株對纖維素的分解速率，做為篩選依據。

（四）菌株形態觀察

將(三)篩選所得菌株以馬鈴薯右旋糖培養基(Difco PDA)培養 1 週後，施以革蘭氏染色(Gram's stain)，在顯微鏡下觀察菌株形態，進行初步分類。

(五) 木材降解試驗

將(三)篩選所得菌株如(三)所述製成懸浮液，取 1ml 平鋪於麥芽抽出物纖維素培養基(0.5% malt extract、0.1% cellulose powder、2% agar powder)，培養 1 週後，於培養基表面放置小玻棒，再於玻棒上放置 35 mm x 30 mm x 3 mm (L x T x R)杉木邊材試片培養 8 週，每個組含重覆 6 個，以杉木試片試驗前後重量差，計算因細菌降解所產生的重量損失。另取重量損失較嚴重的試片，進行徒手切片，在顯微鏡下觀察木材細胞壁降解方式，了解菌株對木材細胞的破壞方式。

三、結果與討論

(一) 初步菌株分離與篩選

由聚積培養過程分離出 17 支純化細菌菌株。其中 10 支(編號 C1 C10)由標本園杉木設施樣本中取得，7 支(編號 D1 D7)由設置之杉木小徑材取得。此 17 支菌株經與纖維素懸浮液振盪培養 10 天後，離心培養液上層澄清液，其糖類含量經測定結果如表 1 所示。

表 1 各菌株纖維素懸浮液中平均低分子糖類濃度

Table 1 Average low molecular weight saccharides concentration from different bacteria-cellulose suspension after incubation.

編號	濃度(ug/ml)	編號	濃度(ug/ml)
C1	74.2	D1	44.0
C2	103.8	D2	111.4
C3	91.6	D3	44.8
C4	96.6	D4	39.2
C5	55.4	D5	44.0
C6	56.6	D6	110.8
C7	49.0	D7	66.4
C8	48.6	對照組	54.7
C9	59.9		
C10	49.6		

由表 1 低分子糖濃度可推測 17 支菌株對纖維素降解的能力，依此選取 C1、C2、C3、C4、D2、D6 及 D7 等 7 支纖維素分解能力較強的菌株(糖濃度明顯大於對照組者)進行後續實驗。

(二) 菌株形態

由(一)篩選得的菌株經革蘭氏染色後觀察，皆為陽性桿菌，其大小及型態列於表 2。

表 2 木材降解試驗用 7 支菌株的形態

Table 2 The morphological characteristics of the seven bacterial strains used for wood degradation test.

編號	形態	大小(um)
C1	革蘭氏陽性桿菌	18.8 x 4.0
C2	革蘭氏陽性桿菌	6.8 x 3.3
C3	革蘭氏陽性桿菌	6.3 x 2.8
C4	革蘭氏陽性桿菌	4.3 x 3.3
D2	革蘭氏陽性桿菌	6.5 x 3.3
D6	革蘭氏陽性桿菌	6.8 x 2.8

(三) 菌株對木材降解能力

將試片與菌株共同培養 8 週後，其重量損失如表 3 所示。就整體的重量損失百分比而言，菌株間重量損失之差異並不大，重量損失皆不嚴重(1.27-1.78%)，故僅能推測細菌菌株雖具有降解木材的能力，但相對於木材腐朽菌降解能力非常小。

表 3 菌株經木材降解能力試驗後之重量損失百分比

Table 3 Weight loss percentage of different bacterial strains after degradation test.

菌株代號	C1	C2	C3	C4	D2	D6	D7
重量損失(%)	1.63	1.78	1.26	1.69	1.66	1.49	1.27

(四) 菌株對木材細胞壁降解方式

經降解試驗後之試塊，以徒手切片法製成切片，於顯微鏡下觀察菌株對木材的侵害方式及降解形態。7 支菌株對杉木細胞降解方式差異不大，橫切面上可觀察到 1. 菌株對 S₁、S₂ 層的侵害會形成一道道整齊的侵蝕溝，試驗菌株皆為侵蝕型；2. 與木質線相接的縱向管胞，因受菌株的降解而於初生細胞壁有孔狀侵蝕的現象，推測菌株的侵害可能是由木質線開始，再逐步向外侵入縱向管胞；3. 薄壁細胞間相接的複合中間層，因受菌株降解而產生剝離的現象。在弦切面上可觀察到 1. 木質線薄壁細胞由於菌株的降解，使細胞壁呈不規則狀；2. 與木質線薄壁細胞相接之管胞，由於菌株的侵蝕而使其細胞壁物質呈現逐步降解的情形。在徑切面的重緣壁孔上，則發現細菌體成群分佈在重緣壁孔周圍，推測可能是細菌藉由壁孔來移動和散佈。

將細菌菌株對杉木細胞侵害的形態，繪製成模式圖，如圖 1，推測如下：

1. 木質線薄壁細胞可能是菌株進入木材的主要通道，並藉由橫向向木質線作移動及散佈，壁孔則為兩相鄰細胞間的通道口，故在壁孔周圍常發現成群菌落集中。
2. 就模式圖中所示，使細胞間發生剝離的現象，可能由於細胞間隙亦為細菌進行移動及侵害的空間，故菌株的侵蝕形態亦有自 S₁ 層逐步向 S₂ 層的情形。
3. 菌株侵害細胞壁的形態，亦有自 S₃ 層向外逐步降解纖維素、半纖維素及木質素，並造成孔狀侵蝕的情形，此種降解形態與白腐菌類似，故推測細菌菌株的酵素系統可能與白腐菌相類似。
4. 自菌株降解細胞的形態整體觀之，發現細菌菌株對細胞壁的侵害及菌落的擴張情況，並無一定模式，通常侵害的發生僅位於與細菌菌株相接觸的部位，故細菌菌株所分泌之酵素可能不具滲透性，除非與細胞接觸，否則並不會造成降解。

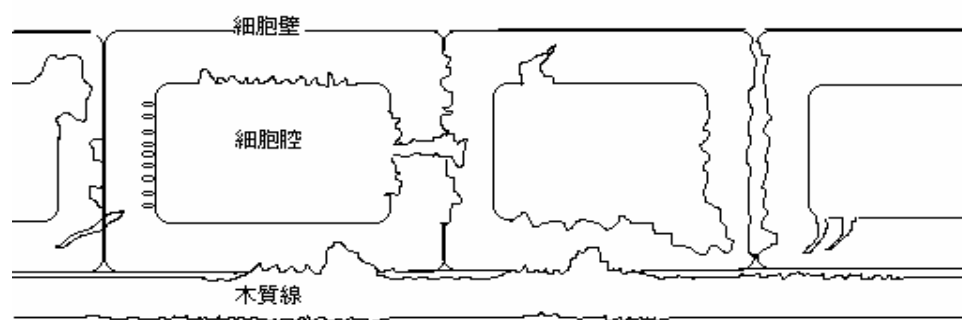


圖 1 細菌對木材細胞壁的破壞方式

Figure 1 The degradation patterns of wood cell walls by bacteria

四、結論

於大礁溪實驗林場標本園杉木設施取得 10 支菌株(編號 C1-C10), 及由設置之杉木小徑材取得的 7 支菌株(編號 D1-D7), 經纖維素分解力測定結果篩選出 7 支(C1、C2、C3、C4、D2、D6、D7)進行後續試驗。革蘭氏染色結果, 確定所篩選出的 7 支菌株皆為陽性桿菌。經木材降解能力試驗結果, 發現重量損失百分比大約在 1.20-1.80%之間, 此結果顯示細菌對木材確實具有降解的能力, 但其對於木材的侵害情況相對於木生腐朽菌而言並不嚴重。

對細胞壁降解的形態方面, 細菌菌株對於木材細胞壁的侵害方式, 並無一定模式, 如對縱向管胞之侵害有自細胞腔向外逐步侵蝕; 或由細胞壁開始逐步向內侵蝕, 使細胞與細胞間產生剝離的現象; 或於細胞壁上形成整齊的侵蝕溝。此外, 對於木質線薄壁細胞的降解, 則呈現不規則狀。形成此類不同降解形態的原因, 可能與其分泌之酵素不具滲透性有關, 除非菌株與細胞接觸, 否則並不會造成細胞壁的降解。且就此 7 支細菌對木材細胞降解的方式來看, 多為自細胞腔向外逐步侵蝕, 此種侵害方式與白腐菌之侵害類似, 故推測此 7 支細菌菌株的酵素系統應與白腐菌類似。

五、參考文獻

1. 林亞立 (1996) 「大礁溪實驗林場伐倒木初期木生真菌之調查」, 宜蘭農工學報, 第十二期, 第 60-72 頁。
2. Levy, J. F. (1973) "Colonization of wood by fungi", News Sheet No.130, British Wood Preserving Association.
3. Baecke, A. A., M. P. Dyker, and B. King (1983) "The role of actinomycetes in the biodegradation of wood", in Bioodegradation 5, (eds T. A. Oxley and S. Barry), pp. 64-74, Wiley-Interscience, New York, USA.
4. Blanchette, R. A., T. A. Nilsson, G. Daniel, and A. Abade (1990) "Biological degradation of wood", in Archaeological Wood Properties, Chemistry and Preservation, (eds R. M. Rowell and R. J. Barbour), pp. 141-174, Advances in Chemistry Series 225, Am. Chem. Soc., Washington, USA.
5. Crawford, D. C. (1978) "Lignocellulose decomposition by selected Streptomyces strains", Appl. and Environ. microbiol., 35 (6), 1041-1045
6. Mouzouras, R. (1989) "Examination of timbers from the Mary Rose in storage", International Research Group on Wood Preservation Document No. IRG/WP/4149
7. Nilsson, T. and G. Daniel (1988) "Bacterial attack of wood cell walls", in Biodegradation 7, (eds D. R. Houghton, R. N. Smith, and H. O. W. Eggins), pp. 739-742, Elsevier Applied Science, New York, USA.
8. Nilsson, T., G. Daniel, and S. Bardage (1990) "Evidence for actinomycete degradation of wood cell walls", International Research Group on Wood Preservation Document No. IRG/WP/1444.
9. Zabel, R. A. and J. J. Morrell (1992) "Wood Microbiology", pp. 82-85, Academic Press, New York, USA.
10. Greaves, H. (1973) "Selected wood inhabiting bacteria and their effect on strength properties and weights of *Eucalyptus regnans* and *Pinus radiata* sapwoods", Holzforschung, 31, 71-79.
11. Eaton, R. A. and R. S. Johnston (1989) "A novel device for detecting internal defects in wood poles", International Research Group on Wood Preservation Document No. IRG/WP/2329.
12. Nilsson, T. (1984) "Occurrence and importance of various types of fungal and bacterial decay in CCA-treated horticultural pine posts in New Zealand", International Research Group on Wood Preservation Document No. IRG/WP/1234.
13. Eaton, R. A. and D. J. Dickinson (1976) "The performance of copper-chrome-arsenic treated wood in the marine environment", Material und Organismen, Suppl, 3, 521-529.
14. Nilsson, T. and A. Singh (1984) "Cavitation bacteria", International Research Group on Wood Preservation Document No. IRG/WP/1235.

15. Daniel, G. and T. Nilsson (1986) “Ultrastructural observations on wood-degradation erosion bacteria”, International Research Group on Wood Preservation Document No. IRG/WP/1283.

91 年 07 月 23 日投稿

91 年 08 月 10 日接受