

# 教育部109年度中小學科學教育計畫專案

## 期中報告大綱

計畫編號：3-5

計畫名稱：土壤微生物之研究與菌種鑑定--結合生物科技的實作課程

主持人：陳玉珊

執行單位：市立臺中女子高級中學

### 壹、計畫目的及內容：

本研究主要目的有指導學生進行土壤微生物相關的專題研究與開發一套與「土壤微生物研究與菌種鑑定」相關的課程。

#### 一、指導學生進行土壤微生物相關的專題研究

學生專題研究方向為「土壤微生物細菌群中表現類似 *mamA* 基因的探討」。 *mam A* 是一個從能感受地磁的趨磁細菌 (*Magnetotactic bacteria*) 中找到的基因，此基因的表現與趨磁細菌感受地磁的能力有關。因學生好奇土壤微生物是如何在下雨過後，被水沖刷、重回適合生存的環境。在查閱相關文獻資料後，發現有趨磁細菌的存在。分布在土壤和水域中的趨磁細菌可透過細胞內磁小體 (Magnetosome) 構造而感知方位，進而重回適合生存的環境。本計畫目的之一是指導學生探討「土壤中細菌能否利用類似磁小體機制重回適合的環境」。

#### 二、開發一套約 18 週的「土壤微生物研究與菌種鑑定」相關的課程

本計畫目地是在台中女中建構一套「實作生物科技與土壤微生物 (Hands-on Biotechnology & Microbes) 菌種鑑定」課程。所設計課程內容包括：校園中土壤中細菌培養、菌落型態觀察記錄、細菌染色 (Simple stain、Gram stain)、細菌多種生化代謝測試、抗藥性測試及利用分子生物技術進行細菌菌種鑑定。

首先，參與本課程高一的學生在利用土壤稀釋倍率 $10^{-4}$ ，以選擇性培養基 (NA、LB、KB) 在室溫與 $42^{\circ}\text{C}$ 下生長環境下，挑選感興趣的單一細菌菌落。將此細菌進行生化特性分析 (Starch、Lipid、Casein 代謝) 與抗藥性 (Ampicillin, Nalidixic acid, Streptomycin) 測試。之後，學生透過細菌菌種鑑定相關文獻閱讀，採用保留性高的 DNA 引子 (bacterial universal primers) 進行聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 以增量細菌 16S rRNA 基因序列。學生將 PCR 產物經 DNA 凝膠電泳進行分離確認後，切取預期大小的 DNA 條帶送交生物科技公司 (Genomics, 基龍米克斯公司) 進行 DNA 定序。最後，每位學生將所獲得的 DNA 序列，利用美國國家醫學圖書館的國家生物技術資訊中心 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 基因的資料庫進行比對，以鑑定堆估該細菌的菌種。

透過學生們菌種鑑定結果，除了可讓學生親自操作菌種鑑定課程外，亦可對女中校園內土壤中細菌種類進行普查。若能長期追蹤觀察土壤微生物相隨四季氣候的週期性變化情形，相信日後對研究全球氣候變遷對土壤微生物影響或土壤微生物抗生素的篩選都能提供許多的資訊。

下表：109-1學期課程規畫表

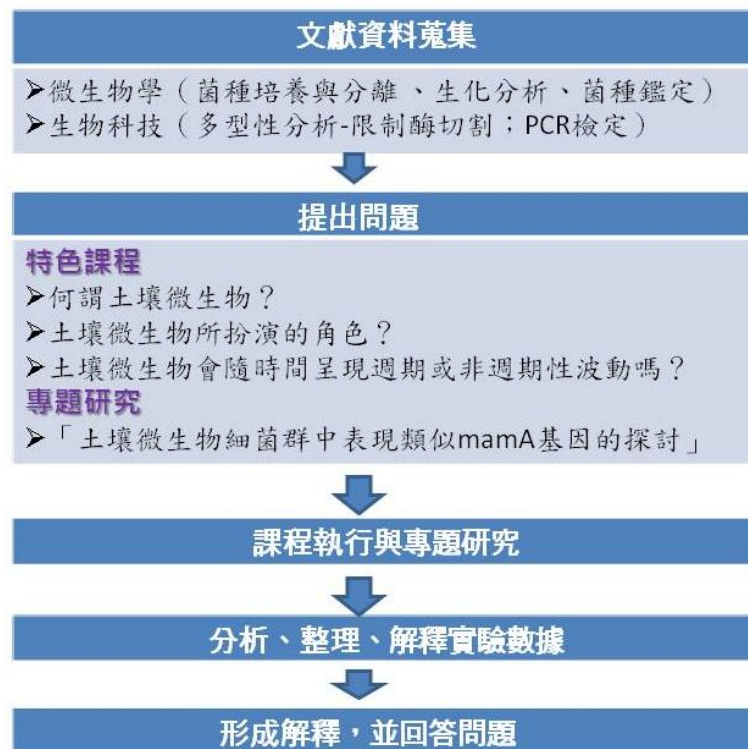
週次	課程日期	教學內容	作業
一	08/31-09/04	課程介紹與微生物的認識	
二	09/07-09/11	微生物培養基的製備 土壤微生物的分離與培養(一)	製備培養基(NA、LB、KB)； 10 <sup>-2</sup> ~10 <sup>-4</sup> 土壤稀釋倍率的培養；培養溫度在 RT 與 42°C 培養（比較）
三	09/14-09/18	土壤微生物的分離與培養(二)	劃線平板（每菌株平均操作 2~3 次），找到單一菌株；菌種保存
四	09/21-09/25	土壤微生物菌落觀察與染色	Simple Stain & Gram Stain 3% KOH 檢測
五	09/28-10/2	中秋節	
六	10/05-10/09	單一菌株生化特性分析	Starch、Lipid、Casein 代謝
七	10/12-10/16	土壤微生物抗藥性測試	
八	10/19-10/23	期中（口頭）報告	
九	10/26-10/30	菌質體感染	大學講座
十	11/02-11/06	鑑定細菌類類別文獻閱讀	文獻閱讀與資料整理
十一	11/09-11/13	PCR 技術鑑定菌種(一)	萃取細菌基因體 DNA
十二	11/16-11/20	PCR 技術鑑定菌種(二)	確認基因體 DNA
十三	11/23-11/27	第二次期中考	
十四	11/30-12/04	PCR 技術鑑定菌種(三)	聚合酶連鎖反應技術(PCR)
十五	12/07-12/11	PCR 技術鑑定菌種(四)	DNA 凝膠電泳
十六	12/14-12/18	PCR 技術鑑定菌種(五)	NCBI 序列分析與菌種判定
十七	12/21-12/25	研究報告撰寫(一)	
十八	12/28-01/01	研究報告撰寫(二)	
十九	01/04-01/08	成果報告(一)	
二十	01/11-01/15	成果報告(二)	

## 貳、研究方法及步驟：

本計畫所採用的研究方法為使用鷹架策略的指導式科學探究法(Scaffold Guided Inquiry Method)。課程設計是先文獻資料的蒐集，在依據 Hands-on Microbes and Biotechnology 的主題設計課程模組。首先，由授課教師引導學習者將先前經驗轉化為可能的探究問題「如何分離與鑑定土壤微生物的菌種？」。透過階段性的實作，各小組最終能將獲得的單一菌種透過多型性分析（限制酶切割）或 PCR 檢定進行該菌種的鑑定。學習者在科學探究活動中的科學推理與經驗的活化，可幫助學習者對實驗結果做

出合理預測並據此提出可行之解決問題的方法。

在科學探究過程中，授課教師與學習者間為一個動態的學習過程。為了提供多元化的、不同類型的學習支持，以幫助學習者專注於學習且避免使學習偏離主題，此研究加入的「教學鷹架策略」包括：將複雜的問題拆解成一個一個簡化的問題、教師提示、教師示範、文獻資料輔助、同儕討論、透過動畫軟體鷹架將討論的原理放在動畫內容中，以引導學習者適合的學習方向，使學習不至於過於雜亂而失焦，並能銜接學習者過去的學習經驗。教學鷹架雖重視由教師提供協助和支援，但學習的責任卻在過程中逐漸的轉移到學生身上。授課教師透過適當的教學引導與師生的互動，讓學生經由高級心智作用將教材內化成自己的知識，然而優秀的學習者不僅有內化能力，還要有主動學習及解決問題的能力。本研究進行步驟如下表：



### 參、目前研究成果：

- 一、指導學生完成「土壤細菌基因體中 mamA 基因表現探討」階段性專題研究，準備投稿 2021年3月份中小學論文比賽。
- 二、在109-1學期高一特色選修課程中，學生已鑑定出台中女中校園中土壤表層約5~10公分處的13種菌種。（以下僅提供12株菌珠資料，另1菌株正在進行序列比對）

strain name	description	identity	coverage
Microbe-1	<i>Bacillus aryabhatai</i>	100%	100%
Microbe-4	<i>Bacillus cereus</i>	100%	100%
Microbe-5	<i>Bacillus megaterium</i>	99.81%	100%
Microbe-6	<i>Bacillus megaterium</i>	99.81%	100%

Microbe-7	<i>Bacillus simplex</i>	100%	99%
Microbe-8	<i>Bacillus megaterium</i>	99.81%	100%
Microbe-10	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99.81%	100%
Microbe-11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99.81%	100%
Microbe-12	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	100%	100%
Microbe-13	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	100%	100%
Microbe-15	<i>Bacillus cereus</i>	100%	100%
Microbe-16	<i>Bacillus megaterium</i>	99.81%	100%

根據上表結果，校園中近表層處的土壤菌種以 *Bacillus* 屬為主。推測可能是該屬細菌的適應環境屬性相似，抑或是學校在進行校園植物栽種時，常購買含有可促進植物生長菌種的培養土有關。此外，Microbe-12是經常造成人類傷口感染的金黃色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*，更是提醒學生們和授課教師土壤細菌中也存在著少量的病原菌，再進行土壤相關研究後請記得手部清潔。

根據實驗結果，部分學生目前正針對一些土壤細菌延伸的問題進行深入探討，例如：一些細菌在培養過程中，菌落由原本的淡黃色因逐代培養，使菌落漸趨透明；兩個菌落型態差異大的菌落，經菌種鑑定後竟為同一種細菌，是受哪些因素所影響？

### 三、在109-1學期高一特色選修課程中，已辦理三場專家學者講座

(一) 2020年10月13日，中興大學植物病理學系，鄧文玲教授－「抗生素抑菌測試」



▲抗生素抑菌測試

(二) 2020年10月28日，中興大學生化所，楊俊逸教授－「菌質體對植物的感染」

(三) 2020年10月28日，艾茵生物科技有限公司研發總監，黃逸喬博士－「基因序列比對與親緣關係分析-常用之線上軟體」



▲菌質體對植物的感染



▲基因序列比對與親緣關係分析-常用之線上軟體

## 肆、目前完成進度：

下表為甘特圖。V 表示目前已完成項目：

時間	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月
收集文獻資料	V	V	V	V	V	V						
發展課程內容		V	V	V	V	V						
土壤微生物的培養與菌落觀察		V										
土壤微生物的分離與純化(單一)土壤細菌的生化特性分析			V	V								
土壤細菌物種鑑定					V	V						
資料分析整理					V	V						
撰寫研究報告					V	V						
編印研究報告												
專題研究計畫	V	V	V	V	V	V						

## 伍、預定完成進度

### 一、收集文獻資料：

一一檢視109-1學期課程進行時遇到的一些問題，查閱相關文獻。閱讀 *Bacillus* 屬相關文獻，以期對校園土壤的物、化環境有更深的認識。

### 二、(繼續)發展課程內容，使本課程更具完整性與系統性。

三、(繼續)指導學生專題研究計畫並參加2021年3月份中小學論文比賽。

### 四、撰寫研究報告和編印研究報告。

## 陸、討論與建議(含遭遇之困難與解決方法)

一、課程前實驗材料準備相當繁瑣，例如：每週需配置(每位)學生所需培養基、使用過培養基需清洗滅菌、實驗不如預期學生想利用課後重作.....。解決方法為學生可利用課程進行時間，操作完後請立即收拾清洗。教師則利用每日課程的空檔或沒課的空堂，配置培養基和滅菌。

二、高一學生先備知識的不足，又礙於授課時間有限，所以有時僅能提到該技術應用，原理則需小組各自討論。解決方法為課程進行時，儘量給予(數次的)小組討論時間。學生也可以透過期中和期末報告，整理和弄懂實作過程相關原理和技術。課後，學生亦可利用課程群組(目前使用 Line 群組)和教師進行細部討論。

三、某些課程單元較專精部分(例如：抗生素檢測與基因序列比對與親緣關係分析)，高中教師須額外花時間準備。準備後的課程也缺乏可討論的對象。解決方法為邀請專家學者到班上上課和帶領學生實作。同時也可提升授課教師的專業知識。

## 柒、參考資料

- Arash Komeili,\* Hojatollah Vali,† Terrance J. Beveridge, and Dianne K. Newman. 2004. Magnetosome vesicles are present before magnetite formation, and MamA is required for their activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(11): 3839–3844.
- Freeman, J., E. Ward, C. Calderon and A. McCartney. 2002. A polymerase chain reaction(PCR) assay for the detection of inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 877-886.
- Kohn, L. M., D. M. Petsche, S. R. Bailey, L. A. Novak and J. B. Anderson. 1988. Restriction fragment length polymorphisms in nuclear and mitochondrial DNA of *Sclerotinia* species. *Phytopathology.* 78: 1047-1051.
- 沈原民. (2002). 菌核細菌的分類及 PCR 鑑定技術.
- 蔡文城. (2002). 微生物學，ISBN：9789576166556，出版社：藝軒。