

教育部 110 年度中小學科學教育計畫專案 成果報告

計畫編號：L32088

計畫名稱：葉圈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：

葉圈 (phyllosphere) 是指在研究微生物時，若微生物的棲息環境是位在(地上部)植物表面的術語。葉圈可進一步細分為附著在莖部 (caulosphere)，葉面，花器 (anthosphere) (花)和果實 (carposphere)的表面。因此，植物的地上部分 (葉，果實，莖等) 統稱為葉圈。其中，葉片組織是植物進行光合作用和能量代謝的中心部位。植物葉圈中存在有各式各樣的微生物，物種多樣性很高。葉圈豐富的微生物相中只有少數微生物會致病；多數微生物可促進植物生長，增強植物的抗病性及抵抗逆境的能力。此外，大多數微生物的存在與植物健康生長間的關係並不清楚。本計畫旨在研究葉圈中微生物相在植物群集的組成和生態功能可能扮演的角色。

2020 年 4 月 8 日，科學期刊 Nature 在線上發表了「A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere」(植物透過遺傳網絡控制葉圈微生物相的穩定) 的研究論文。該篇論文主要是發現了植物可透過基因調控植物的免疫系統 (Pattern-triggered immunity) 和調控葉片水分等相關基因，以控制植物葉圈微生物相的穩定和微生物相的結構。當某些環境因子發生變化時，葉片中的細菌過量繁殖且群落結構發生變化 (不同細菌菌種所佔比例發生變化和失調)，會導致微生物相失衡，並且植物葉部會出現類似病害的黃化和壞死表型。該研究明確的證明植物葉圈微生物相的平衡狀態對維持植物健康生長甚為重要。

葉圈微生物相的研究可能的發展。根據文獻 Eric J. N. Helfrich (2018)，葉圈上的微生物為了有限的營養資源而彼此競爭，透過分泌抗生素或相關的次級代謝物抑制其他物種生長及繁殖，一旦競爭成功便可佔據整個葉表，成為優勢菌群。經純化分析葉圈微生物所產生的次級代謝物，未來可探討該抗生素或代謝物於醫療上的應用性。

為了永續經營生物圈中植物與人類互存的關係。本計畫主要目的是在校園中開發一套系統性的課程「葉圈微生物之研究與菌種鑑定」，透過葉圈細菌的培養→分離→純化、生化代謝分析與菌種鑑定，找出優勢的菌群。學生可依自己找到的菌種深入探討葉圈微生物相的動態變化與環境理化因子(溫度、pH 值與土壤濕度)可能的關聯性。最後，希望建立一套長期追蹤台中女中校園內草本與木本植物葉圈中常見的附生細菌(相)的監控系統，以實踐小型公民科學。

110 學年度第一學期學生在分離葉圈微生物 (細菌) 時的**操作變因**如下：可選擇不同校園植物 (蕨類、草本植物、木本植物)、植物的不同部分 (莖、葉、花、上下表皮)、可以印模法或研磨法分離細菌、可在二種選擇性培養基 (KB、NA) 上培養等。

表一：臺中市立臺中女子高級中等學校 110 學年度第一學期 高一多元選修教學計畫

週次	課程日期	教學內容	作業
----	------	------	----

一	09/1-09/03	課程介紹與微生物的認識	
二	09/06-09/11	微生物培養基的製備 葉圈微生物的分離與培養(一)	製備培養基 (KB、NA)
三	09/13-09/17	葉圈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	09/20-09/24	葉圈微生物菌落觀察與染色(一)	Simple Stain
五	09/27-10/1	葉圈微生物菌落觀察與染色(二)	Gram Stain (3% KOH 測試)
六	10/04-10/08	單一菌株生化特性分析	Starch、Lipid、Casein 代謝測試
七	10/11-10/15	葉圈分離微生物抗藥性測試	中興大學植物病理學系, <u>鄧文玲</u> 教授
八	10/18-10/22	菌質體感染日日春 I	中興大學生化所, <u>楊俊逸</u> 教授
九	10/25-10/29	撰寫完成階段性實驗報告(一)	文獻閱讀與資料整理
十	11/01-11/05	撰寫完成階段性實驗報告(二)	文獻閱讀與資料整理
十一	11/08-11/12	PCR 技術鑑定菌種(一)	萃取細菌基因體 DNA
十二	11/15-11/19	PCR 技術鑑定菌種(二)	文獻閱讀
十三	11/22-11/26	第二次期中考	
十四	11/29-12/03	PCR 技術鑑定菌種(三)	DNA 聚合酶連鎖反應技術(PCR)
十五	12/06-12/10	PCR 技術鑑定菌種(四)	DNA 凝膠電泳
十六	12/13-12/17	菌質體感染日日春 II	中興大學生化所, <u>楊俊逸</u> 教授
十七	12/20-12/24	PCR 技術鑑定菌種(四)	序列分析與菌種判定, 艾茵生物科技有 限公司研發總監, <u>黃逸喬</u> 博士
十八	12/27-12/31	撰寫研究報告	
十九	01/03-01/07	成果報告	

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「如何分離與鑑定葉圈微生物的菌種？」。透過階段性的實作，各小組最終能將獲得的單一菌種並利用 PCR 檢定、DNA 凝膠電泳技術與 DNA 定序與基因庫序列比對來進行菌種的鑑定。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。本研究進行步驟請參考下圖。



參、研究進展與成果：

一、課程研究結果：

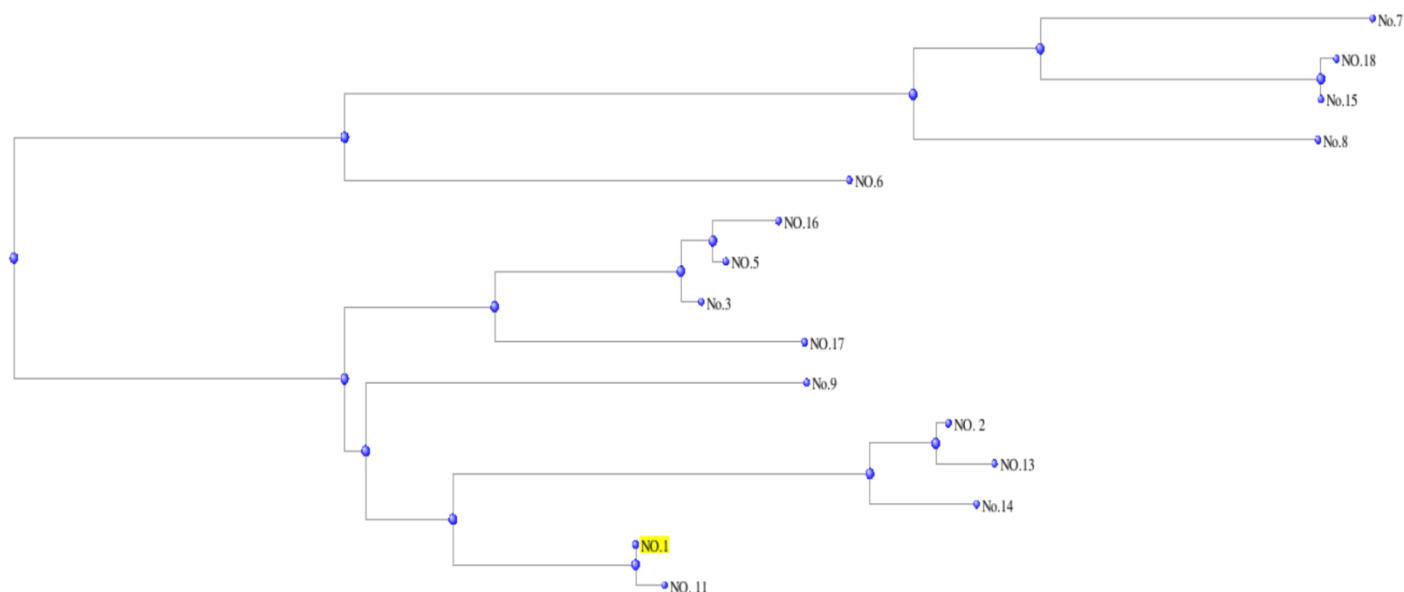
在 110 學年度第一學期高一特色選修課程中，修課學生已鑑定出台中女中校園中 6 種植物葉片表面的 16 種菌株（其中，microbe-1 與 microbe-11；microbe-2 與 microbe-13 為同一種菌株）：根據下表結果，以班上 18 位選修課程學生來編排 strain name：Microbe-1~18；「description」表示分離出的菌種的學名；一致性（identity）表示了兩個序列相同的程度；覆蓋率（coverage）表示序列中有多少比例是有被比對到基因庫中的序列。

strain name	校園植物來源	description	identity	coverage
Microbe-1	黃芭小蝦花	<i>Bacillus cereus</i>	100%	99%
Microbe-2	黃芭小蝦花	<i>Staphylococcus warneri</i>	100%	100%
Microbe-3	黃芭小蝦花	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	99%
Microbe-4	桂花	<i>Pseudomonas hunanensis</i>	100%	100%
Microbe-5	桂花	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100%	100%
Microbe-6	桂花	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	100%	100%
Microbe-7	紫薇花與葉	<i>Curtobacterium citreum</i>	99.73%	100%
Microbe-8	紫薇花與葉	<i>Kocuria indica</i>	99.86%	99%
Microbe-9	紫薇花與葉	<i>Bacillus aryabhatai</i>	100%	99%
Microbe-10	蕨類	<i>Pseudomonas sp. strain</i>	100%	100%
Microbe-11	蕨類	<i>Bacillus cereus</i>	99.60%	100%

Microbe-12	蕨類	<i>Moraxella osloensis</i>	100%	100%
Microbe-13	黃時鐘花	<i>Staphylococcus warneri</i>	98.43%	100%
Microbe-14	黃時鐘花	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.18%	99%
Microbe-15	黃時鐘花	<i>Micrococcus luteus</i>	97.49%	98%
Microbe-16	柏竹	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	100%
Microbe-17	柏竹	<i>Bacillus aquimaris</i>	99.44%	98%
Microbe-18	柏竹	<i>Micrococcus luteus</i>	99%	100%

根據上表分析結果，校園中葉圈細菌多樣性較土壤高。葉圈分離出的微生物有 *Sphingobium*、*Pseudomonas*、*Curtobacterium*、*Kocuria*、*Moraxella* 和 *Micrococcus* 屬的菌種，這些菌種也是之前未能從土壤分離出的。此外，葉圈表面也可分離出 2 種常見的病原菌：*Bacillus cereus* 和葡萄球菌屬（*Staphylococcus*）的菌種，這些細菌也會出現在人體的皮膚上，一般情況下只要皮膚無傷口是不會感染的人類的。但教師還是得時時提醒學生，進行微生物操作實驗時，切勿喝水飲食；結束實驗離開實驗室前，也請洗手並以酒精消毒。

最後，學生們利用美國國家生物技術資訊中心 NCBI 中 BLAST 基因序列比對功能進行全班鑑定菌種親緣關係比對，藉此讓同學比較親緣關係近的菌種間生理生化代謝（Starch、Lipid、Casein 代謝）的差異性。全班學生分析結果（圖四）。



▲圖、學生將所分離出菌種間進行親源關係的比對結果（110 學年度）

二、在 110-1 學期高一特色選修課程中，共辦理四場專家學者講座

- 2021.10.14，中興大學植物病理學系，鄧文玲教授—「抗生素抑菌測試」
- 2021.10.21 與 2021.12.16，
中興大學生化所，楊俊逸教授—「菌質體對植物的感染」
- 2021.12.23，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」

三、學生學習評量方式

劉豐銘(2001，應用專家系統之學習評量診斷策略)認為教學評量對教師、學生有回饋與決策的功能。對教師而言，可以了解學生的起點行為、建立確實可行的教學目標、確定教學目標到達的程度以及改進教材教法、增進教學效果；對學生而言，可增進學生瞭解教學目標、激發學生學習動機、協助學生了解自己的能力和性向、潛能與人格質等、診斷學生的學習與適應困難、輔導學生做最佳的升學、就業、生活方式等選擇。

本計畫採以簡茂發（1996，教學評量）所提的教學評量可分為「形成性評量」(formative evaluation)和「總結性評量」(summative)。前者係在教學過程中，就教師的教學情形與學生的學習表現加以觀察和記錄；後者係在教學活動之末或結束之後，以定期考試或測驗的方式，考查學生的學習成就。本計畫針對學生評量方式如下（表二）。

表二、學習評量的方式

評量種類	使用階段	評量的方式
形成性評量	教學過程中	<ul style="list-style-type: none"> ● 每次課堂中口頭問答 ● 每次課堂中小組任務 ● 實驗結果觀察記錄（科學筆記本） ● 單一菌落進行劃線平板的操作 ● 單一菌落進行塗布平板的操作 ● 簡單染色與格蘭氏染色操作 ● Starch、Lipid、Casein代謝測試結果 ● DNA凝膠電泳操作
總結性評量	教學結束時	<ul style="list-style-type: none"> ● 個人簡報呈現與口語表達 ● 團隊合作與小組分工

肆、已完成進度與項目：下表為甘特圖。V表示目前已完成項目

時間 工作流程	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	V	V	V	V	V	
發展課程內容		V	V	V	V	V	V	V				
葉圈微生物的培養與菌落觀察		V										
葉圈微生物的分離、純化和生化特性分析			V	V								
葉圈細菌物種鑑定					V	V						
資料分析整理					V	V	V					
撰寫研究報告					V	V	V	V	V	V	V	
編印研究報告												
專題研究計畫	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	

一、收集文獻資料：一一檢視 110 學年課程進行時遇到的一些問題，查閱相關文獻，以期對校園葉圈的物、化環境有更深的認識。

二、發展課程內容，使本課程更具完整性與系統性。

三、撰寫研究報告和編印研究報告。

伍、 整體課程討論與建議(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：每週需進行培養基配置與細菌生長、使用過的培養基需清洗滅菌、實驗不如預期學生想利用課後重做實驗。

解決方法：

學生可利用課程進行時間的空檔，操作完後立即收拾清洗；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。課後重做實驗的同學則利用午休和傍晚放學後進行。

- 二、高一學生先備知識的不足，又礙於授課時間有限，無法提及深入課程。

解決方法：

課前教師提供文獻資料或科學網站讓學生先閱讀瀏覽課程相關內容；課程進行時，儘量給予多次的小組討論時間，老師也加入各組的討論；下課後，學生可利用課程群組（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。

陸、 整體課程所帶來的效益

■ 對學生而言：

開發一套完整的課程，能讓學生了解細菌是怎麼一回事？讓學生能嚴謹操作無菌培養，能讓學生閱讀科學期刊文獻，並與課本知識結合進行驗證。最後，啟發學生在不如預期結果背後的繼續追根究柢的探究精神。

■ 對教師而言：

開發一套完整的微生物純化鑑定課程、微生物專業智能與實作技術的提升、教師對實驗室安全規則更堅持。此外，教師時時提醒自己，避免讓學生成為只會做實驗而不動腦的「工匠」。

■ 對學校而言：

高一特色選修課程、偵測校園葉圈微環境與微生物的多樣性

■ 對世界而言：

學生科學研究的啟蒙、科學公民養成。

柒、 參考文獻資料

- 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。
- 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.