

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

目錄

壹、計畫目的及內容	2
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	
貳、研究方法及步驟	4
參、研究進展與成果	5
肆、已完成項目	8
伍、討論與建議(含遭遇之困難與解決方法)	8
陸、參考文獻資料	9
柒、課程中學生的回饋資料	10
捌、整體課程所帶來的效益	12
玖、教授們的建議(期中與期末報告時)	12

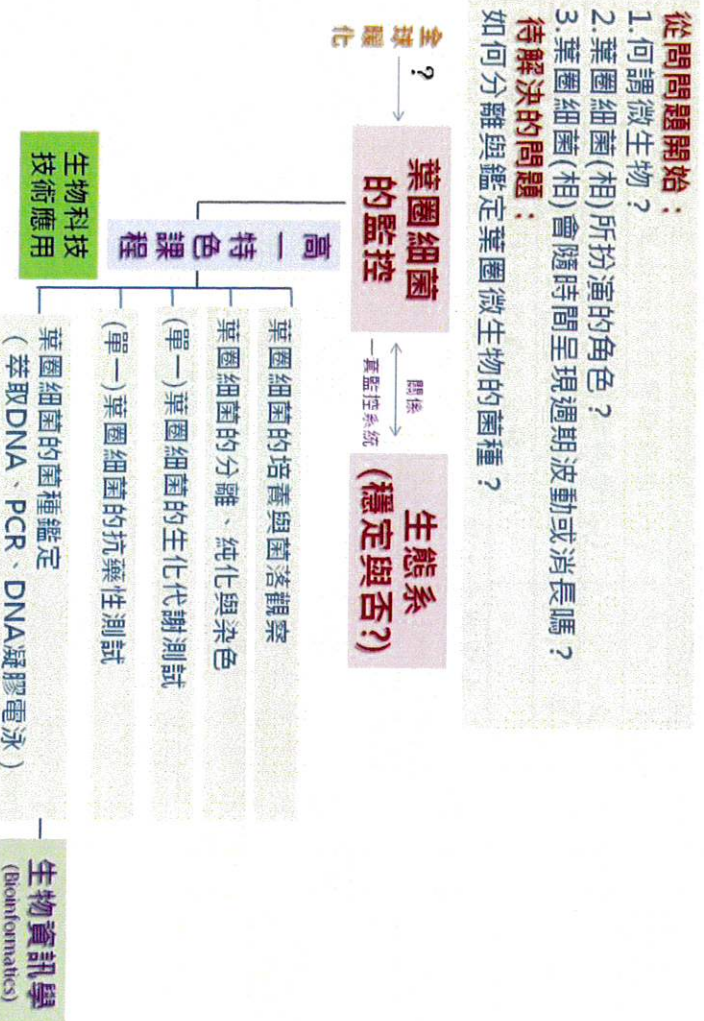
壹、計畫目的及內容：

一、研究計畫的目的：

1. 在高一特色選修課程中開發一個 18 週 (2 學分) 的「葉圈微生物研究與菌種鑑定」的課程，讓本計畫所開發的課程得以實踐，並深耕高中科學教育。
2. 為了永續經營生物園中微生物、植物與人類互存的關係。本計畫目的是建立一套長期追蹤校園草本與木本植物葉圈中常見微生物的監測系統，以了解全球暖化現象，對校園植物可能帶來的影響與變動。

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) 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。

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」(植物的一個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)，導致微生物相失衡，並且植物葉部出現類似病害的黃化和壞死。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。下圖一為本計畫的概念圖。



圖一、本計畫的概念圖

二、研究計畫的內容

本計畫的內容是透過葉圈微生物（以細菌為主）的培養→分離→純化、生化代謝分析（Starch、Lipid、Casein 代謝）、抗藥性（Streptomycin、Oxolinic acid）測試與採用保留性高的 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 凝膠電泳上的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（BLAST: Basic Local Alignment Search Tool），以鑑定該細菌的菌種，並進行相關文獻資料的閱讀。

表一：為台中女中 110-1 學期高一特色選修課程規畫表。

學生在分離葉圈微生物（細菌）時的**操作變因**如下：每組學生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（NA、KB）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

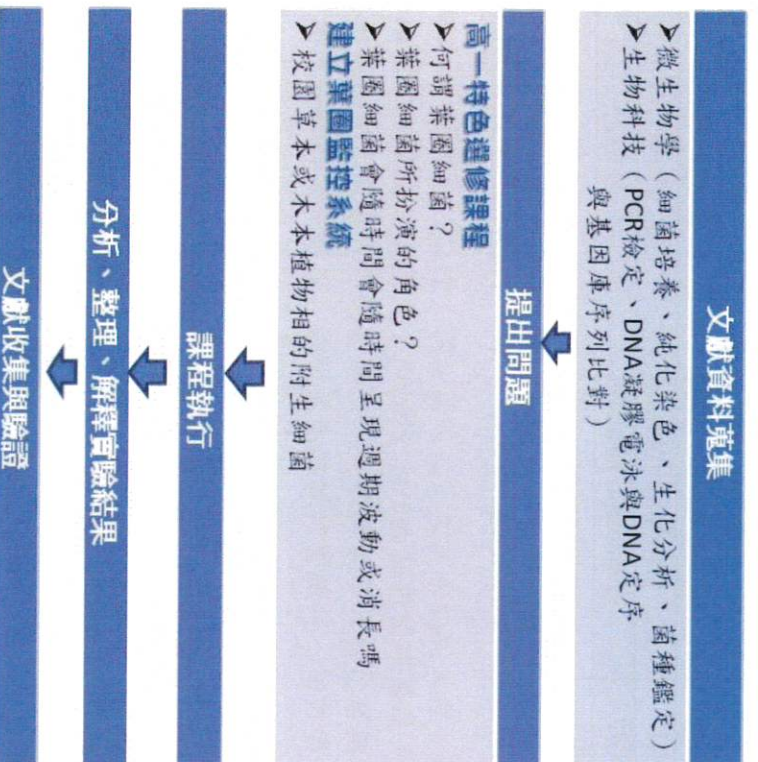
週次	課程日期	教學內容	作業
一	09/1-09/03	課程介紹與微生物的認識	
二	09/06-09/11	微生物培養基的製備 葉圈微生物的分離與培養(一)	製備培養基 (KB、NA) 培養溫度：室溫
三	09/13-09/17	葉圈微生物的分離與培養(二)	劃線平板（每菌株平均操作 2~3 次），找到單一菌株；菌種保存
四	09/20-09/24	葉圈微生物菌落觀察與染色(一)	Simple Stain
五	09/27-10/1	葉圈微生物菌落觀察與染色(二)	Gram Stain
六	10/04-10/08	單一菌株生化特性分析	Starch、Lipid、Casein 代謝測試
七	10/11-10/15	葉圈分離微生物抗藥性測試	中興大學植物病理學系， 鄧文玲教授
八	10/18-10/22	菌質體感染日日春 I	中興大學生化所，楊俊逸教授
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，楊俊逸教授
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，黃逸喬博士
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「What kinds of microbes live on the leaves?」、「What are the functions that the phyllospheric microbes can perform?」「如何分離與鑑定葉圈微生物的菌種?」「Plan an experiment to incubate and isolate one bacterial species (plural: species) from the leaves.」。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。教學鷹架雖然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（圖二）。



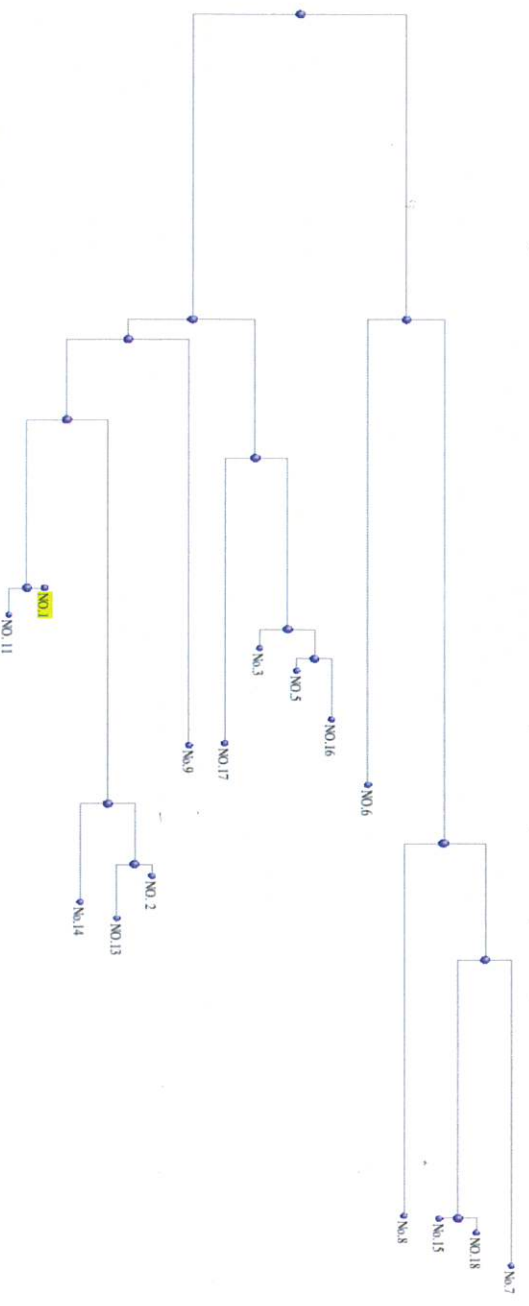
圖二、本研究計畫進行步驟

參、研究進展與成果：

一、在高一特色選修課程開發探索校園內土壤微生物（109學年度上學期）→葉圈微生物（110學年度上學期）的成果。

- 在 110 學年度第一學期高一特色選修課程，18 位修課學生已鑑定出台中女中校園中 6 種植物花、葉表面的 16 種菌株（其中，microbe-1/11；microbe-2/13；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；

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)。



圖四、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，已辦理三場專家學者講座

1. 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」
2. 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」
3. 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」



▲抗生素抑菌測試(110-1)



▲基因序列比對與親緣關係分析-常用之線上軟體(110-1)



▲菌質體對植物的感染課程(110-1)



▲菌質體對植物的感染課程(110-1)

三、學生學習評量：

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、已完成項目：

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
工作流程												
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				
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	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：

閱讀文獻資料：檢視 109 與 110 學年度課程進行時遇到的一些問題。閱讀與葉圈細菌菌種相關文獻，以期對校園葉圈微生物所處的物、化環境與其生長有更深的認識。

二、發展課程內容，使本課程更具完整性與系統性。

伍、討論與建議(含遭遇之困難與解決方法)

- 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做實驗等。
解決方法：學生可利用課程進行時間，操作完後請學生立即收拾清洗。若學生真需要重做實驗，則可利用段考結束後的進行。教師則利用課程的空檔或沒課的空堂，配置課程所需培養基和滅菌。
- 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：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 and 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），授課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：邀請鄰近的中興大學專家學者到班上帶領學生進行實作。同時可提升一旁觀課的高中授課教師的專業知識。

陸、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. Pelsche, 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.

柒、課程中學生的回饋資料： 110-1學年學生回饋資料

一、量性分析：資料來源：臺中市立臺中女子高級中等學校 108 課綱課程課程學習感受量表 (收回 18 份回饋)

編號	同意程度 非常不同意<—>非常同意 1分 5分
1. 我覺得老師上課能引起我的學習動機	4.5
2. 老師會隨時與學生互動與溝通	4.8
3. 老師上課能重視學生的學習回饋，而不是自己講述課程	4.9
4. 老師會針對上課內容做必要的評量 (非限制在紙筆測驗)	3.9
5. 老師會對學生不懂的內容做必要的指導	4.9
6. 我覺得這堂課的上課方式，比較適合我	4.3
7. 我能主動與老師或同學討論課堂問題	4.4
8. 我會主動上網或到圖書館查詢資料尋求解答。	3.9
9. 我會利用時間對課堂中的問題進行思考，並尋求解決方法	4.3
10. 我能規劃這門課程的自我學習內容	4.0
11. 我能夠觀察他人 (組) 作品優缺點並參與討論	4.6
12. 我能主動收集此課程的學習歷程	4.2
13. 我能和同學針對課程互相討論與溝通	4.6
14. 當同學面對課堂問題無法解決時，我能主動幫忙	4.5
15. 我能透過課程的學習互動更加瞭解同學	4.4
16. 和同學的討論中我能提出自己的看法	4.6
17. 遇到問題時，我能尋求同學的協助	4.7
18. 選讀此課程能提升我掌握學習的方法	4.3
19. 選讀此課程能增加我和人溝通或合作的技巧	4.7
20. 選讀此課程後，能增加我對此課程領域的興趣	4.5
21. 選讀此課程後，能讓我獲得相關知識	4.5
22. 選讀此課程後，能讓我獲得相關技能	4.9
23. 我覺得課程內容符合我的程度	4.3
24. 我覺得課程內容符合我的學習需求與期待	4.6
25. 我覺得課程內容豐富充實	4.9
26. 我覺得課程內容能引起我的學習興趣	4.6
27. 上完課程後讓我獲得學習的滿足感	4.7
28. 上這門選修課程讓我感到快樂	4.6
29. 我喜歡這門選修課程，並且推薦其他人選讀此課程	4.6

二、質性分析：資料來源：臺中市立臺中女子高級中等學校 108 課綱課程學習感受量表

1. 選修這門課我確實學到什麼？是否符合我原先選修的期待。

- 如何使用各種實驗器材，並且更了解微生物，符合我原先的期待。
- 我學到很多關於生物科技類的知識，跟我原本想的有點不太一樣但是還是學得很開心。
- 我學到了實驗的方法與操作，以及團隊的合作，也用到了平時不會用到的器具，還培養了細菌，學到專有名詞。
- 學會使用不同實驗器材的方式，符合預期。
- 葉圈細菌的相關實驗與知識；是。
- 學到關於微生物的知識，符合。
- 我學到了很多生物方面的知識，還認識了許多以前沒看過的實驗器材，很開心能參與這次課程。
- 關於實驗的相關器材與實驗注意事項、關於微生物的相關知識，符合我的期待。
- 學習到了與生物相關的知識及專有名詞，有符合我原先選修的期待。
- 這門課我學到非常多關於微生物及實驗的相關知識，也更了解如何整理資料、輸出自己的想法，期末報告也增進了我的口語表達。符合我原先對這門課的期待，甚至還得到一些預期之外的收穫。
- 我確實學到了許多有關葉圈微生物的知識，符合我的期待。
- 我學到了如何培養細菌、嫁接植物的技術以及關於這些的學術知識，至於是否符合期待，我並不清楚，因為我原本就不知道我對這門課的期待是什麼。
- 學會使用實驗器具，了解細菌。
- 我學到如何操作一些平常用不到的科學儀器，還有很多關於微生物的知識；符合我原先選修的期待
- 更多生物的知识、器材操作，是。

2. 你認為課程中那個部分最有興趣，我的印象最深刻？

- 日日春的嫁接實驗。
- 培養細菌。
- 利用革蘭氏染色來觀察細菌。
- 印象最深刻也最有趣的是一開始做的將細菌從葉圈分離的實驗。
- 細菌胞外分泌的實驗。
- 做實驗的時候，第一次養出細菌的時候令我印象最深刻。
- 嫁接日日春的課程，因為較平時培養細菌的課程新鮮。
- 進行畫線平板的時候最讓我印象深刻。
- PCR。
- 我覺得生化特性分析的課程很有趣！
- 在準備 DNA 萃取與鑑定的部分最令我印象深刻。
- 培養細菌的過程。
- 最後在做 DNA 純化時，很充實，步驟很多，因此印象深刻。

3. 我對於選修這門課程的自我學習狀況評估？（認真、主動積極、被動、開心、、等）

- 專心投入
- 雖然有點聽不太懂，可還是會盡力的想去了解，引起我學習的動力
- 認真、積極、開心、有成就感與充實感
- 開心，積極探索，認真
- 積極主動、有成就感
- 主動積極、認真參與
- 認真、主動積極、豐富
- 我感到非常興奮，也使我主動積極
- 進行實驗時認真積極，但寫報告及記錄時十分被動

捌、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。
- **對教師而言：**
開發一套完整的校園葉圈微生物純化鑑定課程與技術、微生物專業智能的提升、對實驗室安全規則更加堅持。此外，教師得時時提醒自己，避免讓學生成為只會做實驗而不動腦的工匠。
- **對學校而言：**
開設高一特色選修課程、能長期偵監控校園葉圈微環境與微生物的多样性
- **對世界而言：**
學生自然科學研究的啟蒙、科學公民養成。



▲全班合影(2022.01.13)

玖、教授們的建議（期中與期末報告時）

- 探究學習導向：
學生各種能力的培養、深化的科學力（例如：16S rRNA 基因引子共通性的詳細介紹，學生了解基礎學科知識後的創造能力）
- 每節課後 Google Classroom 作業，學生優良結果的呈現。
不能僅僅是「體會/體驗/太表面」的實作，而是需「有系統」的實際操作，才能潛移默化的實力與能力養成。
- 預測（Prediction）、觀察（Observation）、解釋（Explanation）的 POE 探究學習模式，能幫助學生以類似科學家的科學思考方式但必須建構在足夠的知識基礎上，且必須要同儕互相協助。
- 建議在課程中加入葉圈微生物相的「物種多樣性分析」課程。藉此更可以追蹤每年校園葉圈微生物多樣性的變化。

葉圈微生物之研究與菌種鑑定 ——結合生物科技的實作課程

- 雖是**一人申請的計畫**... 幸運的是背後校長、行政端、大學端的大力支持
- 開設109、110、111學年度高一**特色選修課程**
- 高中生有機會進行**系統性的科學探索**（微生物學、生物科技、雙語課程）
- 感謝國教署109與110年度中小學科教計畫經費補助

報告者：台中女中生物科 陳玉珊

科學人新聞

從空氣中分析生物多樣性

🕒 2022-04-01

👤 蓋曼 (Katharine Gammon)



鑑定並描述物種是繁瑣工作，
現在，有新的方法：

從空氣中吸取DNA (eDNA)

(environmental DNA)

▲留下蹤跡：從空氣中採集DNA並加以分析，可能有助於記錄蛾和其他昆蟲的存在。

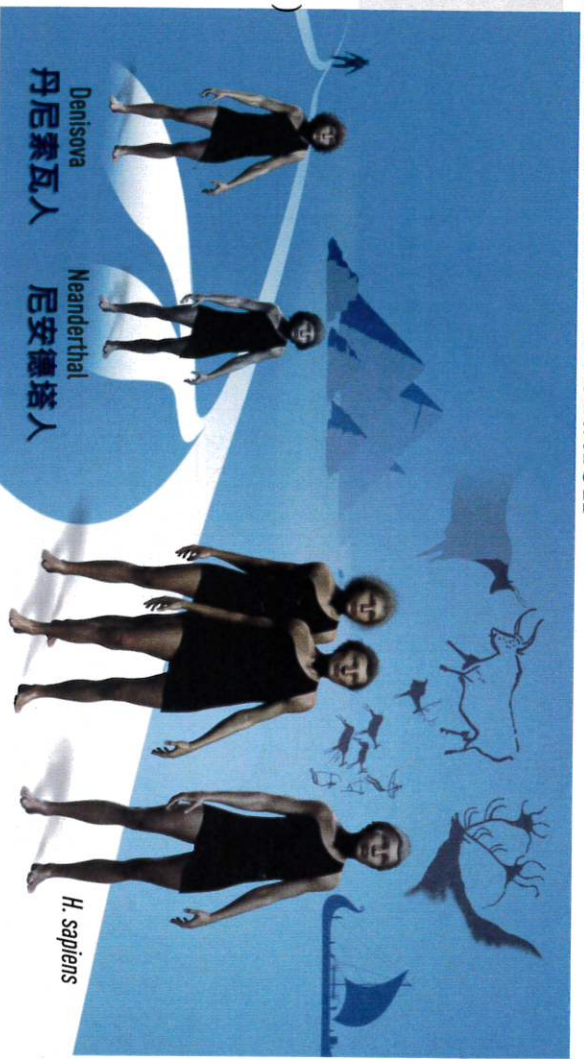
The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2022

“for his discoveries concerning the genomes of extinct hominins and human evolution”



瑞典生物學家

帕波 (Svante Pääbo)

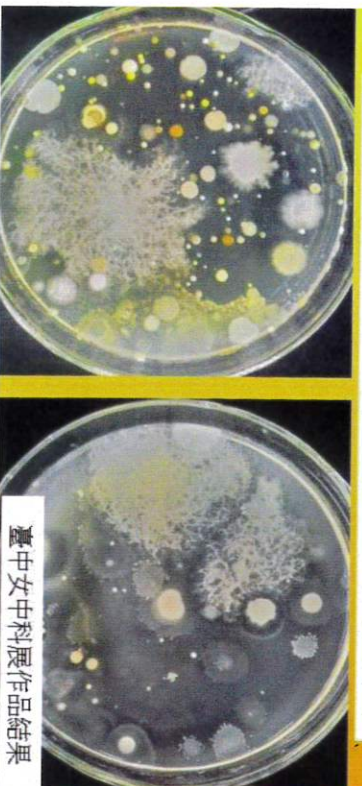


<https://www.nobelprize.org/uploads/2022/10/press-medicine2022-figure4.jpg>

課程設計緣起(一)

■104學年度指導學生科展作品「**土壤微生物監控**」
中區科展「特優」；全國科展「最佳鄉土教材獎」

女中校園內甲、乙區微生物相比較



臺中女中科展作品結果

此科展作品是觀察、記錄台中女中校園內相鄰兩區域的土壤微生物相物種隨時間與環境因子的變化情形。

細菌菌落為由單一細菌在培養基生成之聚合體，
真菌和細菌菌落為單一孢子或菌絲經繁殖聚集所成，可肉眼觀察之。

課程設計緣起(二)

■ 109-1學期，在高一多元選修課中開設「土壤細菌菌種鑑定」課程學生鑑定出校園中土壤表層約5~10公分處的7種菌種

strain name	description	identity	coverage
Microbe-1	<i>Bacillus aryabhattai</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%
Microbe-17	<i>Bacillus megaterium</i>	99.81%	100%

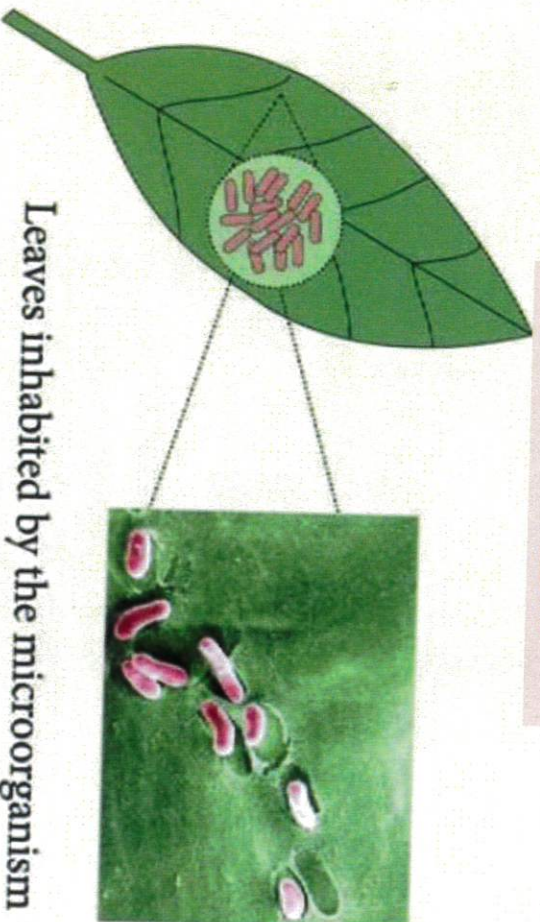
根據左表分析結果：
校園中近表層處的土壤菌種以一種格蘭氏陽性菌芽孢桿菌 (*Bacillus*) 為主。其中，巨大芽孢桿菌 (*Bacillus megaterium*) 和解澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)，是在根系中可促進植物生長和防止病原菌生長的菌株。物種多樣性不如預期高，推測是學校在進行校園植物栽種時，購買含有可促進植物生長菌株的培養土有關。

課程設計的目的

目的是以校園植物葉圈微生物為主角，進行「葉圈細菌相關探究與菌種鑑定」。每位學生將校園木本植物或草本植物花、葉片上所取得的微生物，置於細菌培養基上，經過數次培養→分離→純化，將所純化的單一細菌經過微生物實作課程：細菌染色與油鏡觀察、細菌胞外酵素的分泌與其代謝分析、抗生素抑菌測試、16S rRNA基因與PCR技術增量、DNA定序、NCBI (美國國家生物技術資訊中心) 資料庫進行DNA序列比對及菌種鑑定。希望藉此以找出校園植物葉圈微生物中的優勢菌群。

最後，分析全班每位學生分離出的菌種，探討環境中理化因子(溫度、濕度、光照程度)可能對葉圈微生物造成的影響。最後，希望能建立一套長期追蹤校園植物葉圈微生物(細菌)相的監控系統，讓高中生實際參與與實踐小型公民科學。

葉圈和微生物

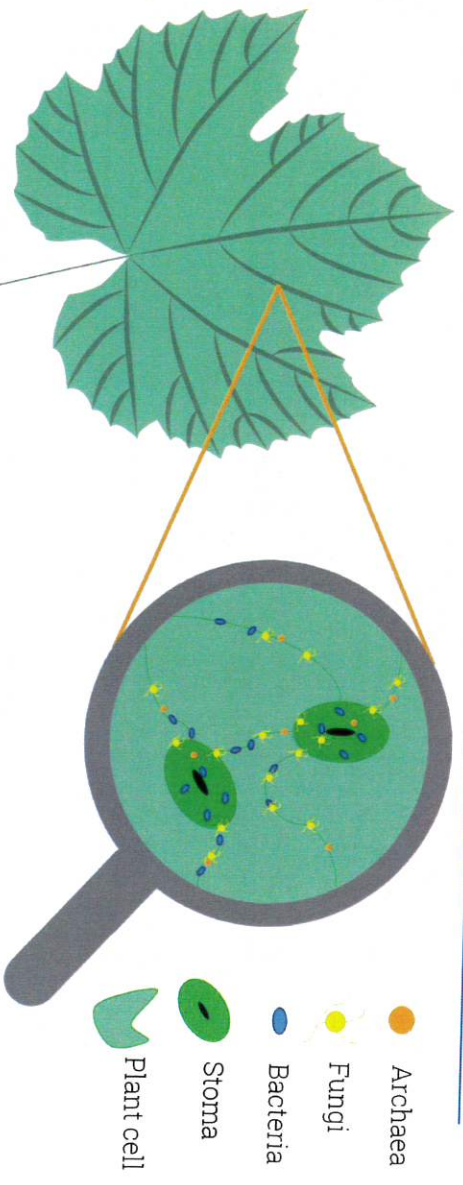


Leaves inhabited by the microorganism

Figure 10.7: Microscopic appearance of Phyllosphere Bacteria
<https://img.brainkart.com/extra3/azVeTCl.jpg>

葉圈和微生物

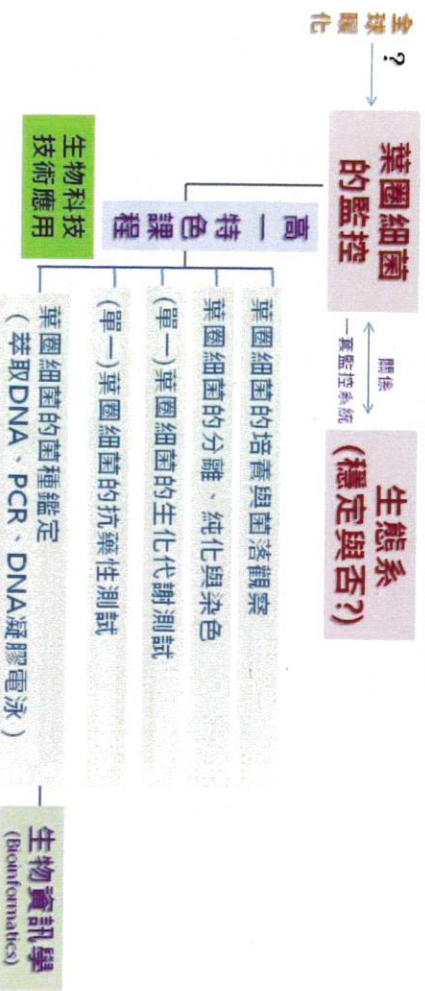
- 植物的地上部分（葉，果實，莖等）統稱為葉圈。
- 葉圈豐富的微生物相可促進植物生長，增強植物的抗病性及抵抗逆境的能力。



110學年度校園葉圈微生物的長期研究-概念圖

從問題開始：

- 1.何謂微生物？
 - 2.葉圈細菌(相)所扮演的角色？
 - 3.葉圈細菌(相)會隨時間呈現週期波動或消長嗎？
- 待解決的問題：
如何分離與鑑定葉圈微生物的菌種？



110學年度校園葉圈微生物的長期研究-教學計畫表

週次	教學內容	作業
一	微生物培養基的製備 葉圈微生物的分離與培養(一)	✓印模法與研磨法 ✓製備培養基：KB、NA ✓培養溫度：RT與42°C培養 (進行比較)
二	葉圈微生物的分離與培養(二)	劃線平板與菌種保存
三	葉圈微生物菌落觀察與染色(一)	Simple Stain
四	葉圈微生物菌落觀察與染色(二)	Gram Stain (同時以3% KOH法測試)
五	單一菌株生化特性分析	Starch、Lipid、Casein生化代謝測試
六	葉圈分離微生物抗藥性測試	中興大學植物病理學系，鄧文玲教授
七	菌質體感染日日春	中興大學生化所，楊俊遠教授
八	撰寫完成階段性實驗報告	
九	PCR技術鑑定菌種(一)	萃取細菌基因體DNA
十	PCR技術鑑定菌種(二)	英文文獻資料閱讀：16SrDNA介紹
十一	PCR技術鑑定菌種(三)	DNA聚合酶連鎖反應技術(PCR)
十二	PCR技術鑑定菌種(四)	DNA凝膠電泳
十三	PCR技術鑑定菌種(五)	序列分析與菌種判定 艾茵生物科技有限公司研發總監，黃逸喬博士
十四	撰寫成果報告	
十五	成果報告發表	

微生物學

生物科技

111學年度 雙語部分

110學年度校園葉圈微生物的長期研究-方法及步驟

鷹架策略的指導式科學探究法 (Scaffold Guided Inquiry Method)

文獻資料蒐集

- 微生物學 (細菌培養、純化染色、生化分析、菌種鑑定)
- 生物科技 (PCR檢定、DNA凝膠電泳與DNA定序與基因庫序列比對)

提出問題

- 高一年特色選修課程
- 何謂葉圈細菌?
- 葉圈細菌所扮演的角色?
- 葉圈細菌會隨時間會隨時間呈現週期波動或消長嗎?
- 建立校園監控系統
- 校園草本或木本植物相的附生細菌

課程執行

分析、整理、解釋實驗結果

文獻收集與驗證

● 實驗手冊閱讀：提升學生閱讀力與理解力

Bacteria Genomic DNA Purification

Things to do before starting:

- Dissolve Proteinase K powder in 1.1 ml sterile H₂O and store at -20°C
- If RNA-free genomic DNA is desired, prepare RNase A solution by dissolving RNase A powder in 220 µl sterile H₂O and store at -20°C
- Preheat water bath or heat block at 37°C, 56°C, 70°C, 80-85°C, 95°C respectively.
- Dissolving lysosthyme powder in lysosthyme solvent: Add 1 ml lysosthyme solvent to lysosthyme powder, vortex until completely dissolved, transfer all the solution to the lysosthyme solvent and store at -20°C

General Procedures:

- * Please follow suggested sample amount to avoid clogging of column, reducing DNA quality and yield.

1. a) Gram-negative bacteria: Centrifuge cells ($< 2 \times 10^8$) at top speed (12,000-14,000 g) for 2 min, carefully remove the supernatant and resuspend bacterial pellet in 200 µl Extraction Solution. Mix by vortexing or pipetting. Proceed to Step 2.
b) Gram-positive bacteria: Centrifuge cells ($< 2 \times 10^8$) at top speed for 2 min, and carefully remove the supernatant. Incubate the pellet in 30°C for 5 min, (or in liquid nitrogen for 30 seconds), and then immediately incubate the tube in 37°C for 2 min. Resuspend the pellet in 180 µl of lysosthyme Solution. Mix by vortexing or pipetting. Incubate at 37°C for 30 min and add 200 µl Extraction Solution. Proceed to Step 2.
2. Add 20 µl of Proteinase K Solution to the microcentrifuge tube, mix by vortexing.
* Do not preheat Extraction Buffer and proteinase K solution before use to prevent proteinase K from undergoing self-digestion without substrate.
3. Incubate sample at 56°C in water bath or incubator for 0.5-1 hours or longer until complete lysis of cell, vortex 5-10 seconds at frequent intervals during incubation.

enzyme + H₂O ~ heat

1. 培養細菌菌落

2. 用滅菌的 tip 吸取菌落

3. 含有 1ml H₂O 的 eppendorf 中
→ 12000 x g 2min (小心離心清液)

dissolve in 200µl Extraction buffer

3 add 20µl proteinase K vortexing

4. 13000rpm 5min

56°C water bath 1h 30min
經常拿起來 vortex

移上清液 eppendorf
+ 200µl binding solution,
95°C for 10min

●實驗設計多樣性：

操作變因：每組學生可選擇不同校園植物、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、二種選擇性培養基（KB、NA）等

1. 採集健康植物葉片1~2片，並記錄植物種類。
2. 先以自然水輕輕的清洗葉片的表面灰塵（用乾葉表水份）。
 - 方法一：葉片印模法（leaf imprint methods）
 - 方法二：葉片研磨法（leaf grinding methods）

以打孔器取6~10個葉片圓盤置於滅菌過的研鉢，取2 ml的0.85 % NaCl 水溶液研磨葉片。利用P200的微量吸管吸取100 μ l的研磨液汁於培養基中，採塗佈平板（Spread plate method）方式，以滅過菌的L型不鏽鋼彎桿，均勻塗抹液汁於KB平板培養基上。

3. 放置室溫培養24~48小時後（隔日中午12:15~12:30請至實驗室觀察紀錄菌落數目、形態與顏色）。教師會將全班培養基至於4℃冰箱保存至下週上課。

1 在 0.2 mL 微量離心管中加入下列各項反應物：

DNA	染色體 DNA		直接刮取菌種	
	5	5	5	5
引子	甲引子	乙引子	甲引子	乙引子
Forward primer (10 μ M)	2		2	
Reverse primer (10 μ M)	2		2	
5 \times Mix buffer (Taq DNA 聚合酶、dNTPs、緩衝液)	4		4	
ddH ₂ O	9	9	9	9
total volume (μ L)	20	20	20	20

dNTPs：dATP、dGTP、dCTP、dTTP。

建議藥品加入的順序：ddH₂O→引子→DNA→5 \times Mix buffer(酵素最後加)

●專家學者講座：專家專業指導，讓學生的學習更精準



▲抗生素抑菌測試(110-1)

▲基因序列比對與親緣關係分析-常用之線上軟體(110-1)



▲菌質體對植物的感染課程(110-1)



▲菌質體對植物的感染課程(110-1)



校園葉圈微生物的長期研究-課程結果 I

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 humanensis</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>Curvobacterium 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 aryabhattai</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%

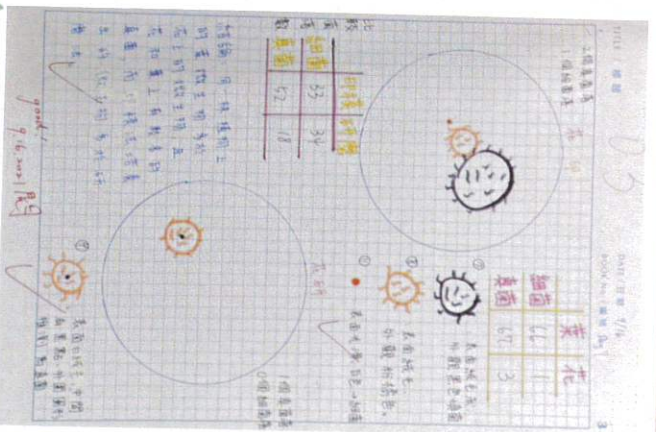
根據左表分析結果：

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。

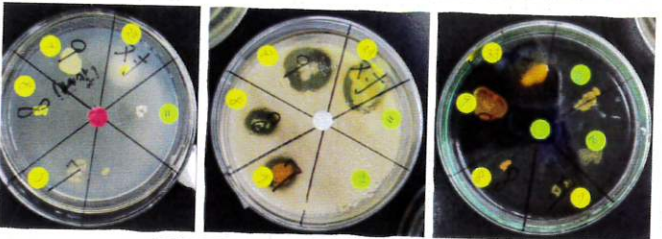
校園葉圈微生物的長期研究-學生學習評量方式

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

校園葉圈微生物的長期研究-學生各項實驗記錄



▲分離葉圈微生物紀錄



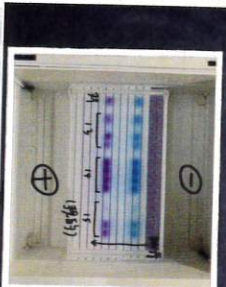
▲細菌生化分析



▲細菌抗藥性檢測

透化圈直徑：
2.5
2
1.5
1
0.5
0

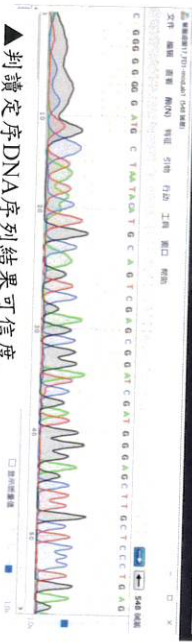
4 20 100
抗生素濃度



● DNA凝膠電泳



紫外光照射下的結果：



▲判讀定序DNA序列結果可信度

校園葉圈微生物的長期研究-已完成進度

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
工作流程												
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						
撰寫研究報告					V	V						
編印研究報告					V	V			V	V	V	
專題研究計畫	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	

校園葉圈微生物的長期研究-學生回饋(量化分析)

編號	同意程度 非常不同意<—>非常同意
1. 我覺得老師上課能引起我的學習動機	4.7(109-1) / 4.5(110-1)
2. 老師會隨時與學生互動與溝通	4.8 / 4.8
3. 老師上課能重視學生的學習回饋，而不是自己講述課程	4.8 / 4.9
4. 老師會針對上課內容做必要的評量（非限制在紙筆測驗）	4.4 / 3.9
5. 老師會對學生不懂的內容做必要的指導	4.8 / 4.9
6. 我覺得這堂課的上課方式，比較適合我	4.6 / 4.3
7. 我能主動與老師或同學討論課堂問題	4.7 / 4.4
8. 我會主動上網或到圖書館查詢資料尋求解答。	4.4 / 3.9
9. 我會利用時間對課堂中的問題進行思考，並尋求解決方法	4.4 / 4.3
10. 我能規劃這門課程的自我學習內容	4.1 / 4.0
11. 我能夠觀察他人（組）作品優點並參與討論	4.6 / 4.6
12. 我能和同學收集此課程的學習歷程	4.2 / 4.2
13. 我能和同學針對課程互相討論與溝通	4.7 / 4.6
14. 當同學面對課堂問題無法解決時，我能主動幫忙	4.6 / 4.5
15. 我能透過課程的學習互動更加瞭解同學	4.7 / 4.4
16. 和同學的討論中我能提出自己的看法	4.6 / 4.6
17. 遇到問題時，我能尋求同學的協助	4.7 / 4.7
18. 選讀此課程能提升我掌握學習的方法	4.4 / 4.3
19. 選讀此課程能增加我和人溝通或合作的技巧	4.7 / 4.5
20. 選讀此課程後，能增加我對此課程領域的興趣	4.7 / 4.9
21. 選讀此課程後，能讓我獲得相關知識	4.8 / 4.9
22. 我覺得課程內容符合我的程度	4.7 / 4.6
23. 我覺得課程內容豐富充實	5.0 / 4.9
24. 我覺得課程內容能引起我的學習興趣	4.8 / 4.7
25. 上完課程後讓我獲得學習的滿足感	4.8 / 4.6
26. 我喜歡這門選修課程，並且推薦其他人選讀此課程	4.9 / 4.6

校園葉圈微生物的長期研究-所帶來助益

■對學生而言：

一套系統性的科學課程（細菌學 + 生物科技 + 生物資訊）
與課本知識的結合、在**不如預期結果背後的繼續探究精神**
雙語課程（111學年度國教署部分領域雙語計畫執行的課程）

■對教師而言：

專業智能的提升、對實驗室安全規則更堅持（與敏感）
得時時提醒自己，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、台中市科學展覽與全國科展、校際間合作
校園葉圈微環境與微生物（細菌）的多樣性

■對世界而言：

科學研究啟蒙、科學公民養成

課程照片



▲抗生素抑菌測試



▲親緣關係分析-常用之線上軟體



▲全班合影(2022.01.13)