

教育部112年度中小學科學教育計畫專案

期中報告大綱

計畫編號：2-1

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：生物科教師 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：

一、研究計畫的目的：

以校園植物葉圈（phyllosphere）上的微生物（microbes）為主角，進行「葉圈細菌探究與菌種鑑定」。每位學生將校園木本植物或草本植物花、葉片上所取得的細菌，經過數次培養→分離→純化，並將所純化出的單一種細菌經過微生物實作課程：細菌染色（simple stain & Gram stain）與油鏡觀察（Oil immersion lens）、細菌胞外酵素的分泌與其代謝分析（The extracellular hydrolytic enzyme test）、抗生素抑菌測試（Antibiotic resistance experiment）、16S rRNA 基因與 PCR 技術增量、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。希望藉此以找出校園植物葉圈細菌中的優勢菌群。

本研究希望能建立一套長期追蹤校園葉圈微生物（細菌）相的監控系統，透過分析每年學生所分離出的葉圈細菌相的種類，了解生物多樣性動態變化，並進一步探討與全球氣候變遷的可能關係，以實踐小型公民科學。

從問問題開始：

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？



圖一、本計畫的概念圖

二、研究計畫的內容：

本研究計劃內容包含「4B」：細菌學 (Bacteriology)、生物科技學 (Biotechnology)、生物資訊學 (Bioinformatics)，是以雙語教學 (Bilingual teaching) 方式進行課程。

表一：臺中市立臺中女子高級中等學校112學年度第一學期高一多元選修教學計畫

週次	教學主題	教學內容
一	葉圈細菌的分離與培養(一)	leaf imprint methods (印模法) 與 leaf grinding methods (研磨法)
二	葉圈細菌的分離與培養(二)	Spread plate method & Streak Plate Method
三	葉圈細菌菌落型態觀察與染色(一)	Simple Stain
四	葉圈細菌菌落型態觀察與染色(二)	Gram Stain
五	單一菌株生化特性分析	The Extracellular Hydrolytic Enzyme Test (Starch、Lipid、Casein)
六	葉圈分離細菌抗藥性測試	Antibiotic resistance experiment 艾茵生物科技有限公司研發總監， <u>黃逸喬</u> 博士
七	菌質體感染日日春 I	中興大學生化所， <u>楊俊逸</u> 教授
八	撰寫完成階段性實驗報告	
九	PCR 技術鑑定菌種(一)	The structure of DNA
十	PCR 技術鑑定菌種(二)	Micropipette usage
十一	PCR 技術鑑定菌種(三)	Polymerase Chain Reaction, PCR
十二	PCR 技術鑑定菌種(四)	DNA gel electrophoresis
十三	PCR 技術鑑定菌種(五)	DNA sequenced based bacterial taxonomy 基因序列比對與親緣關係分析 艾茵生物科技有限公司研發總監， <u>黃逸喬</u> 博士
十四	菌質體感染日日春 II	中興大學生化所， <u>楊俊逸</u> 教授
十五	撰寫成果報告	
十六	成果報告發表	

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 in phyllosphere 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「人體體表覆蓋許多好的共生菌種，以維護人體身心健康。那麼校園中的綠色植物體表是否也有微生物長期定居呢？」、「如何分離與鑑定葉圈微生物的菌種？」。透過階段性的實作，每位同學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。

學習者在科學探究課程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、教師的眼神與肢體語言、圖像照片

（Infographic）、動畫軟體、Youtube影片、文獻閱讀、同儕討論等多模擬態的鷹架，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。本研究進行流程請參考（圖二）。



圖二、本研究進行流程

叁、目前研究成果：

- 在 112 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植物葉圈 13 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）表示序列有多少比例是有被比對到基因庫中的序列。

strain name	description	identity	coverage
Microbe-1	<i>Bacillus altitudinis</i>	99.87%	95%
Microbe-2	<i>Pantoea anthophila</i>	100%	100%

Microbe-3	<i>Bacillus cereus</i>	99.48%	98%
Microbe-4	<i>Bacillus xiamenensis</i>	99.74%	96%
Microbe-5	<i>Bacillus cereus</i>	99.74%	98%
Microbe-6	<i>Bacillus cereus</i>	99.87%	99%
Microbe-7	<i>Bacillus sp.</i>	96.93%	100%
Microbe-8	<i>Bacillus mobilis</i>	99.87%	99%
Microbe-9	<i>Bacillus pumilus</i>	100%	100%
Microbe-10	<i>Priestia megaterium</i>	99.86%	98%
Microbe-11	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	94.22%	97%
Microbe-12	<i>Priestia megaterium</i>	100%	100%
Microbe-13	<i>Rossellomorea marisflavi</i>	99.74%	98%
Microbe-14	<i>Bacillus thuringiensis</i>	96.01%	94%
Microbe-15	<i>Priestia megaterium</i>	100%	99%
Microbe-16	<i>Bacillus cereus</i>	94.85%	93%
Microbe-17	<i>Pantoea ananatis</i>	98.66%	99%
Microbe-18	<i>Cronobacter universalis</i>	99.73%	99%

根據上表學生校園葉圈菌種結果，葉圈分離出的微生物有 *Bacillus*、*Pantoea*、*Priestia*、*Lysinibacillus*、*Rossellomorea*、*Pantoea* 和 *Cronobacter* 屬的菌種。其中，以 *Bacillus* 屬的細菌種類最多。*Bacillus cereus* 是常見的病原菌，此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無法感染的人類。*Priestia megaterium* 根據最近科學界研究結果發現，此種細菌可以有助於植物抵抗環境逆境；*Pantoea ananatis* 原本是土壤中常見的腐生菌，近日科學界發現其也是造成蔬果病害的病原菌。此課程研究目的除了分析校園葉圈細菌種類之外，之後也會比較110年、111年與112年校園葉圈細菌物種多樣性的變化。

- 112-1學期高一特色選修課程中，已辦理四場專家學者講座
 1. 2023.10.26，艾茵生物科技有限公司研發總監，黃逸喬博士
—「葉圈分離細菌抗藥性測試」
 2. 2023.11.02 與 2021.12.21，中興大學生化所，楊俊逸教授—「菌質體感染日日春 I & II」
 3. 2023.12.14，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」

肆、目前完成進度

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	✓	✓	✓	✓	✓							
發展課程內容		✓	✓	✓	✓							
土壤微生物的培養 與菌落觀察		✓										

土壤微生物的分離與純化(單一)		V	V	V	V							
土壤細菌生化特性分析			V									
土壤細菌抗藥性能力分析				V								
土壤細菌物種鑑定					V							
資料分析整理					V							
撰寫研究報告					V							
編印研究報告												

伍、預定完成進度

一、比較110年、111年與112年校園葉圈細菌物種多樣性的變化

查閱物種多樣性指標相關資料，希望可以「相對數值大小」代表校園葉圈細菌多樣性多寡。此外，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、閱讀文獻資料與（繼續）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。

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、實驗不如預期學生需利用課後重作等。

✓ **解決方法：**學生可利用課程進行時間，操作完後馬上收拾清洗。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：**課程進行時，儘量重複"出現"（說或寫）重要概念（concepts）。此外，學生可以透過中期末報告，整理和弄懂實作過程相關原理和技術。課後，學生則可利用課程群組（目前使用 Line 群組）和教師進行細部討論。

三、部份課程單元需較專業(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：**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。

四、整學期的課程是以雙語方式進行，擔心學生會因為雙語而對課程學科知識不了解。

✓ **解決方法：**以自編學習單、自製字(圖)卡&教具、圖片&影片等多模擬態方式提供學生足夠的學習鷹架（Multimodality & Sufficient scaffolding）。並以 Open AI 輔助教師與學生英文口說的練習，減輕學習的負擔與焦慮。

柒、參考資料

- 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.
- Helfrich E.J.N. et al. Bipartite interactions, antibiotic production and biosynthetic potential of the Arabidopsis leaf microbiome. Nat Microbiol. 2018 Aug;3(8):909-919.
- 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。