

教育部 112 年度中小學科學教育計畫專案 成果報告

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

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 112 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	5
參、研究進展與成果	6
肆、已完成項目	9
伍、討論與建議(含遭遇之困難與解決方法)	10
陸、參考文獻資料	10
柒、整體課程所帶來的效益	10

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. 為了永續經營生物圈中微生物、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。

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？



圖一、本計畫的概念圖

二、研究計畫的內容

本研究計畫涵蓋「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。

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。

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)、以**印模法或研磨法**分離細菌等。

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 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。

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

(Inforgraphic)、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

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）→葉圈微生物（110、111、112學年度）的成果。

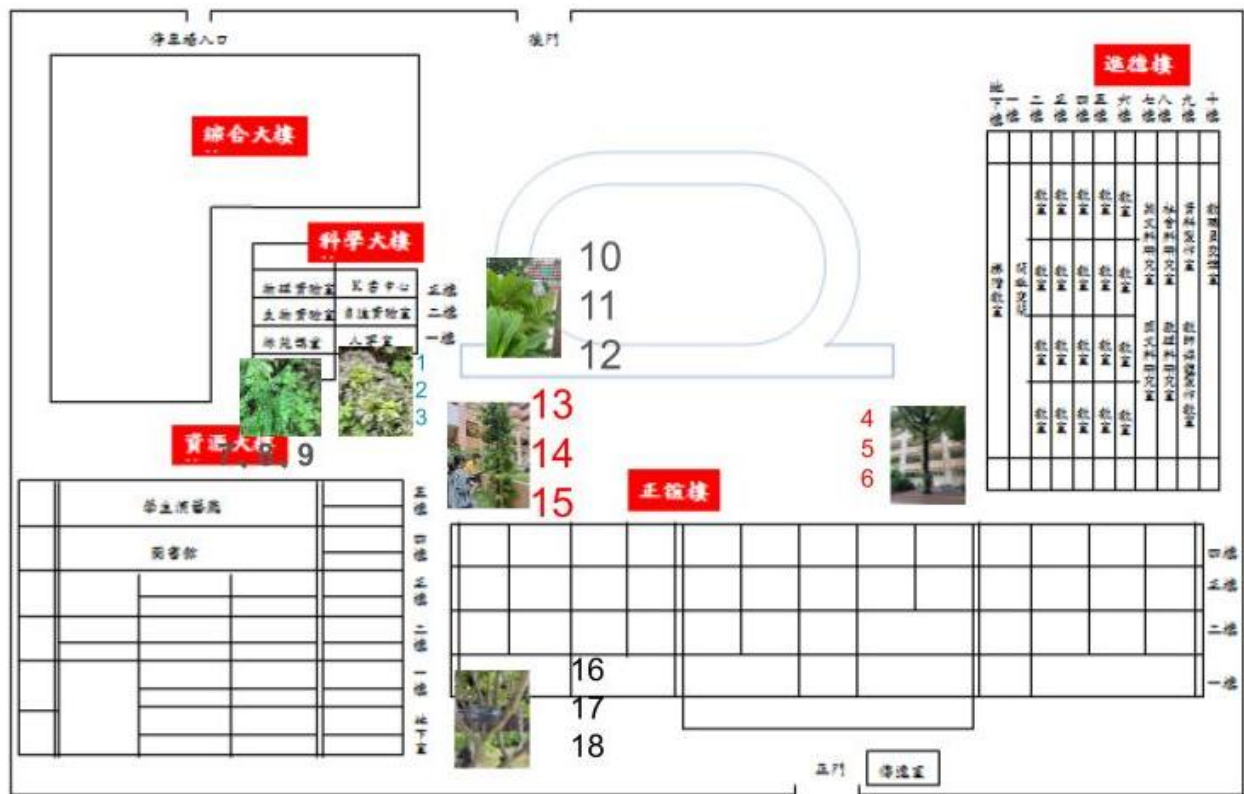
- 在 112 學年度高一特色選修課程中，修課學生已鑑定出台中女中校園植物葉圈 13 種菌株。根據下表結果，以班上 18 位選修課程學生來編排 Microbe-1~18；「description」表示分離出的菌種的學名；一致性（identity）表示兩條比對序列相同的程度；覆蓋率（coverage）表示序列有多少比例是有被比對到基因庫中的序列。

strain name	校園植物來源	description	identity	coverage
Microbe-1	鵝掌藤	<i>Bacillus altitudinis</i>	99.48%	98%
Microbe-2		<i>Pantoea anthophila</i>	99.74%	96%
Microbe-3		<i>Bacillus cereus</i>	99.74%	98%
Microbe-4	楓香	<i>Bacillus xiamenensis</i>	99.87%	99%
Microbe-5		<i>Bacillus cereus</i>	96.93%	100%
Microbe-6		<i>Bacillus cereus</i>	99.87%	99%
Microbe-7	葉下珠	<i>Bacillus sp.</i>	100%	100%
Microbe-8		<i>Bacillus mobilis</i>	99.86%	98%
Microbe-9		<i>Bacillus pumilus</i>	94.22%	97%
Microbe-10	緬梔花	<i>Priestia megaterium</i>	100%	100%
Microbe-11		<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	99.74%	98%
Microbe-12		<i>Priestia megaterium</i>	96.01%	94%
Microbe-13	蘭嶼羅漢松	<i>Rossellomorea marisflavi</i>	100%	99%
Microbe-14		<i>Bacillus thuringiensis</i>	94.85%	93%
Microbe-15		<i>Priestia megaterium</i>	98.66%	99%
Microbe-16	緬梔	<i>Bacillus cereus</i>	99.73%	99%
Microbe-17		<i>Pantoea ananatis</i>	99.48%	98%
Microbe-18		<i>Cronobacter universalis</i>	99.74%	96%

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。從近幾年的課程分析結果，發現隨著每年年平均雨量增加，校園葉圈細菌的種類也增加。

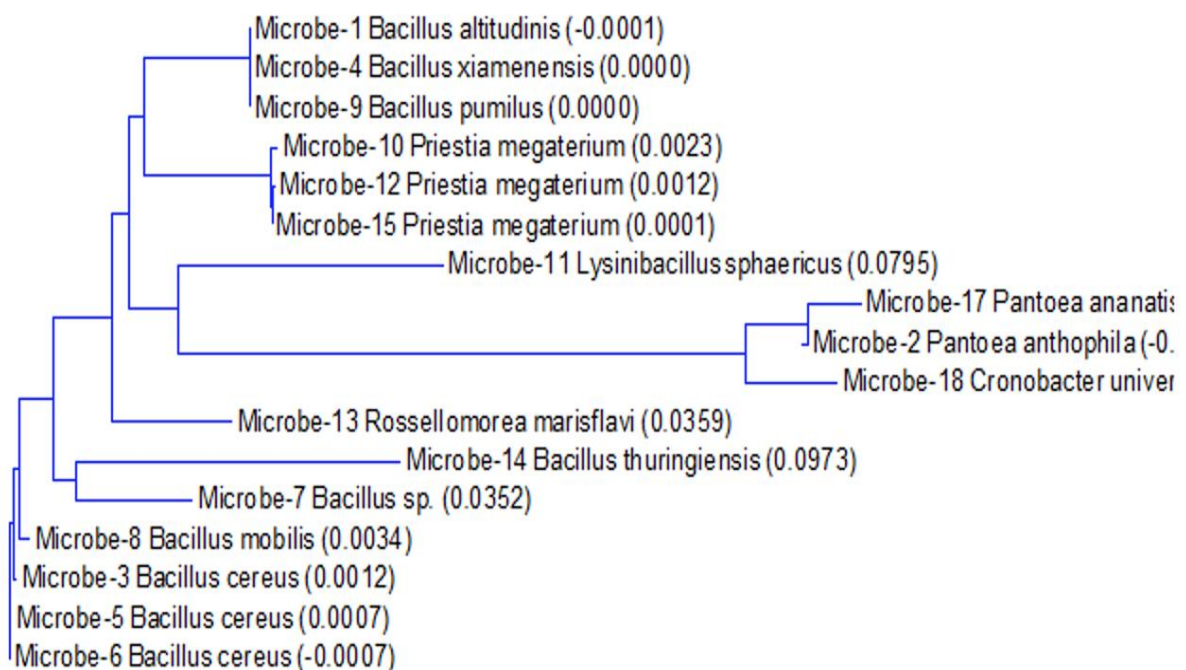
教授也建議下次可以植物的花器(有蜜腺、有水氣)進行細菌菌種的分離，所分離菌種會較多。此外，因 *Baccilus* 屬的細菌喜歡生長在乾的葉片上，所以可解釋學生所分離多為 *Baccilus* 的細菌。

臺中女中校園地圖



▲圖三、女中校園與 Microbe 1~18 微生物所在的植物分布（112 學年度）

最後，學生們利用 NCBI 中 BLAST 基因序列比對功能進行全班 18 個菌株親緣關係比對，藉此讓同學比較親緣關係近的菌種間生理生化代謝（Starch、Lipid、代謝）的差異性。全班學生分析結果如下（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（112 學年度）

二、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」

●**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(112-1)



▲基因序列比對與親緣關係分析-常用之線上軟體(112-1)



▲菌質體對植物的感染課程(112-1)



▲菌質體對植物的感染課程(112-1)

三、學生學習各種評量：

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"> ● 每次課堂中與同學們的口頭問答 ● 每次課堂中分派給小組的任務 ● 實驗結果觀察記錄 ● 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，並以手機拍攝所觀察到的細菌 ● Starch、Lipid、Casein代謝測試結果 ● DNA凝膠電泳的操作流程與結果
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

四、學生對此課程的回饋：

- 我覺得 DNA 序列分析很好玩是因為我努力研究那麼久的細菌，我終於可以知道它是誰了，而且有關的實驗操作也激起我對生物的興趣。
- 這門選修讓我學到很多，譬如：閱讀英文的科學文章、實驗器材使用、團隊合作的重要性等，對我而言很有意義。
- 我很開心可以參與這門課程，讓我從中學到了很多科學的方法和有趣的實驗操作，也讓我更了解細菌的生活型態和細節，讓我更想往這方面發展。
- 得到了很多實驗經驗，也讓自己的英文閱讀能力提升，認識了更多和細菌相關的英文單字以及在撰寫英文文章的技巧。
- 雙語部分：練習怎麼讀英文文獻，英文能力加強，尤其是閱讀部分。中文註記也從一開始的幾乎整張講義都滿滿的，到最後變得只剩下一些真正沒學過的單字。
- 實驗部分：真正把所學到的知識化為實作，讓人印象更深刻，上課時同時也怕自己等會不會做實驗，所以會更加專注的聽。做實驗的同時也增加課程趣味性，讓人不會只有聽老師講課聽得昏昏欲睡。

肆、已完成項目：

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				
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：

閱讀與葉圈微生物相關文獻資料，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：多方參與相關研習或講座，以期讓課程更具完整性與系統性。

三、由課程發展開啟專題研究：

本校高一數資班學生林○嫻同學，正針對課程中所純化出的 Microbe-10 與 Microbe-12 細菌進行專題研究。Microbe-10 與 Microbe-12 都是從校園植物緬梔花葉子上取得，皆是 *Priestia megaterium*，根據文獻資料顯示此細菌可增加植株的耐鹽能力和促進植物合成生長素的能力。相較於傳統以基因轉殖抗逆境基因方式產生之抗逆境作物，使用細菌幫助作物生長和抵抗非生物性逆境，已成為一種趨勢。目前林○嫻同學，正在以此細菌處理葉菜類植物（例如：小白菜），觀察該葉菜植物在各種鹽類逆境下的容忍程度。

四、建立跨校間的科學合作關係：

今年 2024 年 4 月友校文華高中生物科教師來電詢問關於菌種鑑定方式，詢問廠商後得知一個細菌株物種鑑定需 7,500 元，價格昂貴且同時有多個菌株待鑑定，故打消請生物科技公司鑑定細菌種類的念頭。因本課程所建立起的細菌菌株鑑定流程詳盡完備，故協助文華高中進行菌種的鑑定，最後鑑定出的三株細菌分別為 *Pantoea eucrina strain*、*Bacillus subtilis* 與 *Deinococcus ficus*，其中 *Deinococcus ficus* 是可以分解角質層的細菌，呈現亮橘色的菌落型態，若有興趣可以更進一步進行該菌種相關研究。在高中端，若實驗室能有一套鑑定細菌菌種的儀器設備，每株細菌僅需花費在請生物科技公司定序 DNA 序列即可，費用是一個細菌株 250 元。

此次的細菌鑑定開啟了台中女中與文華高中日後科學學合作的可能性。文華高中的生物老師也來參訪本校實驗室，希望有機會也可以建立一間分子生物學實驗室。

伍、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當天的空檔的進行。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。

- 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），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. 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.

柒、整體課程所帶來的效益

- 對學生而言：
 - ✓ 一套系統性的科學探索課程（生物學＋細菌學＋生物科技＋生物資訊）
 - ✓ 深化科學力和奠定基礎後的創造力
 - ✓ 雙語課程（111,112 學年度國教署部分領域雙語計畫執行的課程）

用另一種語言，來學習科學。

■ **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樣性、建立與友校的科學合作機會。

■ **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 (2024.01.11)