

教育部110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：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：本計畫主要有二個目的

1. 在高一特色選修課程中開發一個 18 週的「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，並深耕科學教育。
2. 為了永續經營生物圈中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

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

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。

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，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（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）；培養溫度在 RT 與 42℃ 培養（比較）
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， 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「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（圖二）。



圖二、本研究計畫進行步驟

參、目前研究成果：

- 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109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土壤表層約5~10公分處的7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 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>	99.8%	100%

根據上表分析結果，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。推測可能是該屬細菌在土壤中所生活的物化環境相似。其中，5位同學純化出巨大芽孢桿菌 (*Bacillus megaterium*)。在農業上，*Bacillus megaterium* 是有機肥中常用的菌株，可用於土壤中固磷和固鉀的生物性肥料，且對土壤中的有機磷有很好的降解作用。而解澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)，被認為是一種根系中可防止病原菌生長的菌株，在農業和水產養殖中可用於對抗一些植物根部病原體。本計畫在校園土壤中所分離出的 *Bacillus megaterium* 和 *Bacillus amyloliquefaciens* 菌株的來源，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。本人再與學校總務處工友先生確認後，近2年學校校園植株摘種已經不使用外面購買的培養土，所以無法取得培養土來進一步分析培養土中的優勢菌種。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和相關的防護。

- 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；

「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 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%

根據上表學生校園葉圈菌種結果，發現校園中葉圈細菌多樣性較土壤細菌多樣性高。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無法感染的人類。故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。

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」

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、目前完成進度：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			
發展課程內容		V	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	V	V	V			
資料分析整理					V	V	V	V	V			
撰寫研究報告					V	V	V	V	V			
編印研究報告												

伍、預定完成進度

- 一、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、(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、實驗不如預期學生想利用課後重作.....。
解決方法：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：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、部份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

1. 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.
2. Helfrich EJN. et al. Bipartite interactions, antibiotic production and biosynthetic potential of the Arabidopsis leaf microbiome. Nat Microbiol. 2018 Aug;3(8):909-919.
3. 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.
4. 沈原民. (2002). 菌核細菌的分類及 PCR 鑑定技術。