

中華民國第 65 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 植物學科

052108

探索校園中有助於植物抵抗逆境之菌株

學校名稱：臺中市立臺中女子高級中等學校

作者： 高二 楊子嫻	指導老師： 陳玉珊
-------------------	------------------

關鍵詞： *Priestia megaterium*、抗逆境、內生菌

摘要

本研究旨在校園植物上篩選出使植物對抗逆境具有潛力的菌株。首先，將校園植物葉圈與維管束內部分離出的細菌進行生理生化分析及篩選後，分離出三株對植物生長無不良影響之 *Priestia megaterium* 菌株。實驗結果顯示，*P. megaterium* 能共生於番茄苗中，將番茄幼苗處理 *P. megaterium* 菌株兩週後，能協助番茄植株抵抗土壤鹽化而存活，或是當土壤環境有油污污染時亦能使植物維持生長，因此具有幫助植物抵抗不良逆境之潛力。未來則希望能更進一步探討 *P. megaterium* 與植物間如何相互作用而抵抗逆境。

壹、前言

一、研究動機

隨著氣候變遷帶來的極端氣候事件日益頻繁，不穩定的氣候條件嚴重影響作物生長，對糧食供應安全構成威脅。為應對極端氣候對農業生產的影響，農民需投入更多資源以維持產量，甚至過度施用肥料，不僅加重農業生產成本，亦經常導致土壤退化、水源污染，造成惡性循環（Hung et al, 2023）。

有益菌在自然界中對植物生長的調控具有潛力，可以透過增強作物的抗逆境能力，提升農業的永續性（Hwang et al, 2021 ; Bach et al, 2016）。因此，希望能尋找有益菌，提供除了基因轉殖以外，對環境低負擔、低污染的方式提升植物抗逆境能力和生長效率。

在篩選具有潛力的有益菌時，經過 *16S rDNA* 定序分析發現其中三株為 *Priestia megaterium* 與一株為 *Bacillus amyloliquefaciens*。過去有許多研究提出 *P. megaterium* 可能與植物共生並增強植物應對酸性、鹼性逆境的能力（Biedendieck et al, 2021 ; Thakur et al, 2024），故本研究選擇 *P. megaterium* 為抗逆境研究的主要菌株（Luo et al, 2022）。

二、研究目的

- (一) 從校園植物中，篩選具有幫助植物抵抗逆境的潛力菌株。
- (二) 測試澆灌了各種菌液的番茄苗，在不同的逆境下的生長情形。
- (三) 分析抗逆境潛力菌株生長過程所分泌的物質，並探討菌株使植株抵抗逆境的可能途徑。

三、文獻回顧

Priestia megaterium 巨大芽孢桿菌（過去稱為 *Bacillus megaterium* (Haskett et al, 2020)），擁有眾多專利和工業應用。此細菌可作為遺傳研究和重組蛋白生產的模式生物，它的尺寸高達 $2.5 \times 10 \mu m$ 。屬於革蘭氏陽性桿菌，具有低 G+C (~38%) 基因組，並形成內生孢子。過去被應用於多種領域，包括生物修復、重組蛋白的生產、細胞內和細胞外物質的合成等。它能夠利用各種碳源進行代謝，並且在不同的環境中展現出良好的生物適應性。*P. megaterium* 生產了包括維生素 B12、纖維素、酶類、疫苗、抗體片段等產品，在醫學、生物能源和食品工業中有廣泛的應用。而透過對不同菌株基因定序，能夠更好地理解其遺傳背景，進而開發出能夠生產特定產品的菌株。*P. megaterium* 的一些菌株，如 DSM32 和 QMB1551，已在基礎研究中發揮了重要作用，特別是在孢子形成和蛋白質生產方面 (Biedendieck et al, 2021)。

部分 *P. megaterium* 菌株能夠內生於植株內，且大多菌株具有促進植物生長的基因 (Mahmoud et al, 2024)。菌株 BP-R2 是從鹽沼鹽生植物 *Bolboschoenus planiculmis* 經表面滅菌根組織中分離出來的。細菌菌株 BP-R2 在各種測試的生長條件下產生生長素植物激素吲哚乙酸 (IAA)。用菌株 BP-R2 接種擬南芥和小白菜 (*Brassica rapa* LR Chinensis Group) 植物，增強了宿主植物在正常以及鹽和乾旱脅迫條件下的生長參數 (Hwang et al, 2022)。

貳、研究設備及器材

一、研究材料

(一) 番茄種子 (農友 301, 台灣)

(二) *Priestia megaterium* 菌株 10、2-1、2-2 號 (校園植株上採集)

二、研究器材

Nutrient agar 營養培養基 (HiMedia, India)、Tween 80 培養基 (1% peptone, 1% KBr, 0.025% $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.5% agar, pH 7.0)、育苗穴盤、塑膠盆 (盤)、2.5 吋黑色塑膠軟盆、泥炭土、蛭石、珍珠石、氯化鈉 (Sigma) 於培養基測試，或台灣精鹽 (土壤逆境測試)、機械廢油、滅菌過濾器 (0.22 μm , Millipore)、C18 逆相層析管柱 (ProElut)、甲醇、針筒

二、研究設備

分光光度計 (Thermo)、離心機、培養箱、高壓滅菌器、-80°C 冰箱、溫室

參、研究過程或方法

本研究分為三部分，初篩、土壤澆灌，與抗逆境物質分析。

一、初篩

從環境中分離並挑選出具有幫助植株抗逆境潛力的菌株，分為以下實驗。

(一) 採集並分離菌株

本研究採用的菌株來自校園中緬梔花和番茄，將植株進行表面消毒後取葉片與莖部磨碎，並塗抹於 NA 培養基 (Nutrient Agar, NA) 使菌株生長。利用條紋板法技術 (streak plate method) 純化出單一細菌。

(二) 初步測試植物幼苗添加微生物對逆境生長之影響

將挑選出的細菌加水以分光光度計 (Thermo) 測定濃度，調配成 OD₆₀₀ 值 0.3 的菌液後，取 4mL 加入水中，再添加不同的不良環境因子，例如鹽分、強酸、強鹼或油污，來模擬田間可能會遇到的不良環境因子，配製成水溶液。將發芽約 2 週的番茄苗根部沖洗乾淨後浸泡於水溶液中，觀察番茄苗的生長狀態，並挑選出使番茄生長狀態較佳的菌株進行下一階段的土壤澆灌實驗。

(三) 對挑選出的菌株進行逆境測試

為了瞭解菌株本身是否耐受逆境，當面對環境逆境時仍具有存活能力，同時能促進植株抵抗逆境。因此將菌株培養於不同生長條件下，並觀察其生長情形。

1. 高溫測試

將畫有菌株的培養基依次放置於 40°C、45°C、50°C 的培養箱環境下，觀察各菌株的生長情形。

2. NaCl 濃度測試

將菌株依次畫在 3%、5%、8%、10% NaCl 濃度的培養基上，觀察各菌株的生長情形。

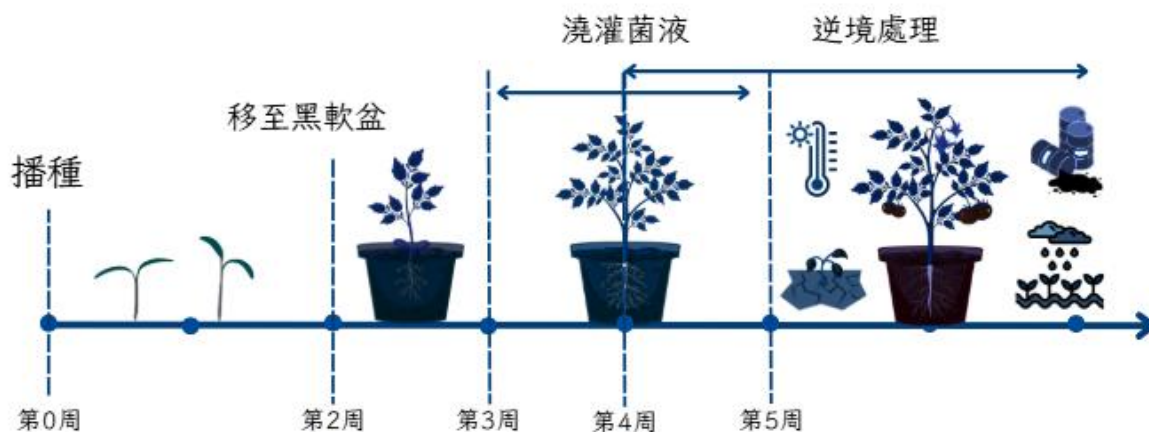
3. 水解脂質能力測試

透過脂質水解測試可以讓我們了解菌株是否具有脂質水解酵素 (lipase)，未來可能減緩油污污染的情形。將菌株點在含有聚山梨醇酯 (polysorbate) 與氯化鈣的 Tween 80 培養基上，觀察其周圍是否有白色沉澱物。

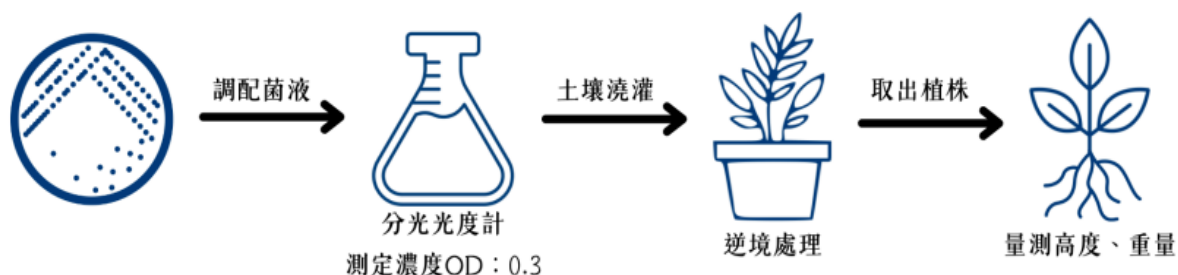
原理：Tween 80 為含脂類結構之界面活性劑 (non-ionic detergent)，若細菌可分泌脂質水解酵素則可將其脂類之結構水解而釋出脂肪酸，與培養基中的鈣離子結合，形成白色的脂肪酸鈣沉澱 (Von Tigerstrom et al, 1989)。

二、土壤澆灌

選用經濟價值較高之番茄做為研究材料，將種子放置於穴盤，2 週後將發芽的小苗移至黑軟盆（淹水逆境處理則留在穴盤中不移盆），1 週後開始澆灌菌液，進行實驗處理。番茄苗處理時間序如（圖一）。初篩後挑選出的菌株以分光光度計測定濃度，並調配成 OD₆₀₀ 值 0.3 的菌液。以灌溉菌液於土壤的方式，使每株番茄苗接種 OD₆₀₀ 數值為 0.3 之菌液 5 mL，每週一次，持續 2~3 週。接著放置於不同逆境條件下，最後分析植株重量、高度等成長指標（數據以 Student t-test 處理），選出具有幫助作物抵抗逆境的菌株。實驗操作流程如（圖二）每組不同的實驗皆重複進行 3 次。不同的環境因子處理有一般條件、高溫、乾旱、高鹽度、淹水與油汙汙染六種。



圖一、番茄苗生長與處理菌株時間序。（第一作者 Canva 自行製作）



圖二、番茄處理菌株後進行逆境處理之流程。（第一作者 Canva 自行製作）

(一) 一般條件

將已移盆至黑色塑膠軟盆一週的番茄植株，分別接種菌株 10、2-1、2-1 號 2 週後，在一般溫室中每 2 天澆一次水，成長 3 週後收取植株生長相關數據。

(二) 高溫逆境

將已移盆至黑色塑膠軟盆一週的番茄植株，分別接種菌株 10、2-1、2-1 號 2 週後，放置於夏季無溫控的溫室環境（正午溫度白日溫度約攝氏 43 度，夜晚溫度約 28 度），成長 3 週後收取植株生長相關數據。

(三) 乾旱逆境

將已移盆至黑色塑膠軟盆一週的番茄植株，分別接種菌株 10、2-1、2-1 號 3 週後，在一般溫室停水生長 10 天，恢復供水 1 週後收取植株生長相關數據。

(四) 高鹽度逆境

將已移盆至黑色塑膠軟盆一週的番茄植株，分別接種菌株 10、2-1、2-1 號 2 週後，放置於一般溫室並於澆灌第 2 週菌液當週開始每株澆灌濃度為 50 mL 200 mM NaCl 水溶液，每週一次，持續 3 週後，再生長 1 週後收取植株生長相關數據。

(五) 油汙汙染逆境

將已移盆至黑色塑膠軟盆一週的番茄植株，分別接種菌株 10、2-1、2-1 號 3 週後，放置於一般溫室並每株澆灌工廠機械廢油 10 mL，每週一次，持續 2 週後，再生長 1 週後收取植株生長相關數據。

(六) 淹水逆境

種子放置於穴盤 3 週發芽後，不將番茄苗移盆至黑軟盆，將 10 mL 的菌株 10、2-1、2-1 號菌液分別平均澆灌於穴盤上，每週一次，持續澆灌 3 週後將接種了不同菌株的穴盤分別放入塑膠盆中，加入水使水位淹過根基部，生長 3 週後收取植株生長相關數據。

三、抗逆境物質分析

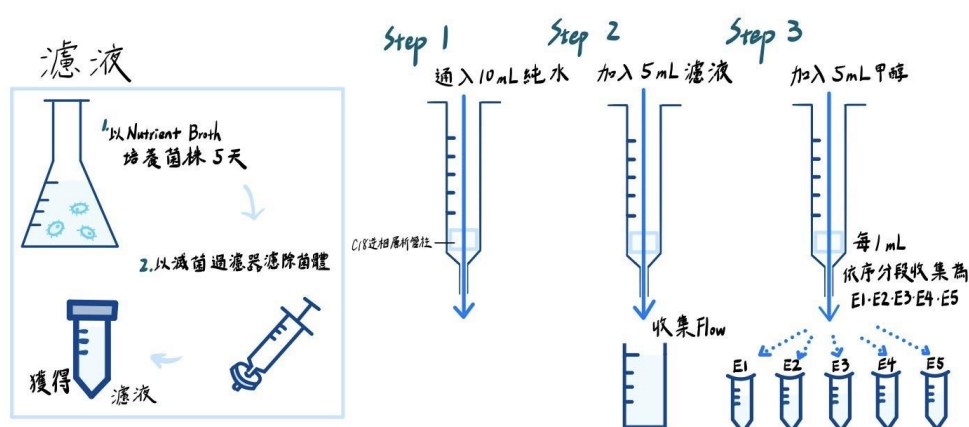
(一) 以去除菌體所得的濾液浸泡番茄苗

挑選出土壤澆灌實驗中具有效果的环境因子處理與菌株組合，將番茄苗浸泡加有去除了菌體的濾液水溶液並觀察生長情形。水溶液以 40mL 的純水和 500 μ L 200 mM NaCl 水溶液配成，並分別加入 3mL 菌株 10、2-1、2-1 號的濾液，而對照組則加入 3mL 無添加菌株的培養液。濾液的部分則是先將菌株 10、2-1、2-1 號以液態培養 1 週後，以 10000 rpm 離心 5 分鐘後取上清液並使用滅菌過濾器（0.22 μ m, Millipore）過濾使菌體本身去除，製成濾液。將番茄苗浸泡水溶液並觀察，是否含有菌株生長代謝物的濾液即能有協助番茄苗抵抗逆境的效果。

(二) 以分提濾液浸泡番茄苗

完成濾液促進抵抗逆境測試後，選擇協助番茄苗抵抗逆境效果較佳之濾液，使用 C18 逆相層析管柱，以純水和甲醇將濾液分提 (fractionation) 成六層，分別為極性較高而溶於水層的 flow 與極性較弱，以 5 mL 甲醇分段提出的 E1、E2、E3、E4、E5，每層 1 mL。

水溶液以 40mL 的純水和 200 mM 之 500 μ L NaCl 水溶液配成，配置 6 管分別加入 1mL 分提後的濾液 (flow、E1、E2、E3、E4、E5)。同樣將番茄苗浸泡水溶液，並觀察 6 層液體中何種對幫助番茄苗抵抗逆境的效果較佳。



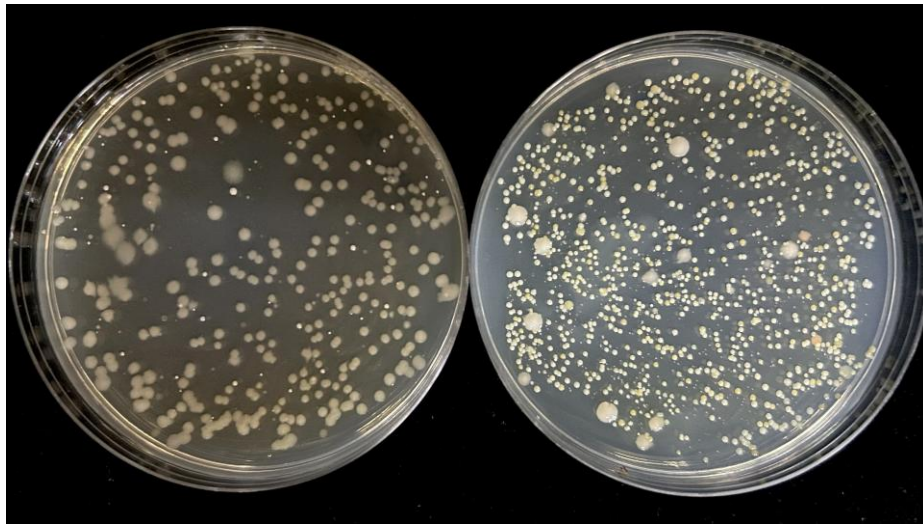
圖三、過濾菌液與分提濾液的步驟。（第一作者自行繪製）

肆、研究結果

一、初篩

（一）採集並分離菌株

將校園中植株進行表面消毒後取葉片與莖部磨碎，並塗抹於培養基使菌株生長一週後的結果如（圖四），再利用條紋板法技術純化出單一細菌。經三次分離後，成功分離出單一菌株，以菌落型態的不同分離與去除了重複的菌株後，得到了 7 株菌，而各菌株以分離順序編號命名，分別為 2-1、2-2、3-1、3-2、3-3、3-4 和 10 號。



圖四、於校園植株上採集到未分離的菌株。（第一作者自行拍攝）

（二）初步測試植物幼苗添加微生物對逆境生長之影響

自植物葉圈與維管束內經過多次純化分離，篩選出 7 株菌進行初步測試。番茄苗分別浸泡分離出來之 7 株微生物，測定菌量 10^8 CFU/mL 取 500 μ L 加入 40 mL 水所配製的水溶液後觀察生長狀態，三天的生長狀態如（圖五）。而添加了逆境的部分，番茄苗添加上述微生物配製之水溶液外，每管則再添加 500 μ L 200 mM NaCl 水溶液進行觀察番茄生長狀態，十天後的生長狀態如（圖六）。



圖五、番茄苗浸泡微生物之生長結果。（第一作者自行拍攝）



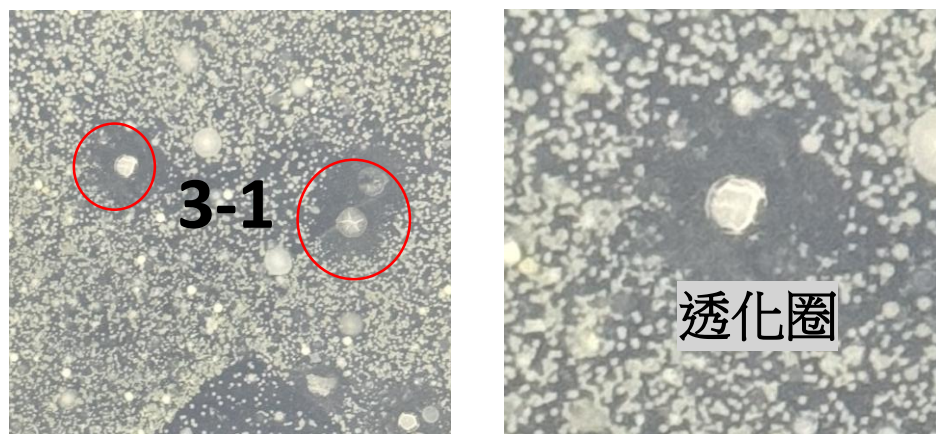
圖六、番茄苗浸泡微生物與處理高鹽之生長結果。（第一作者自行拍攝）

CK 為未添加任何微生物的對照組，在僅添加微生物的處理中（圖四）可直接觀察到編號 10、2-1、2-2、3-1 生長狀態較好，沒有葉片下垂或軟爛的現象。而在添加了鹽類後的處理中，也同為編號 10、2-1、2-2、3-1 生長狀態較好。

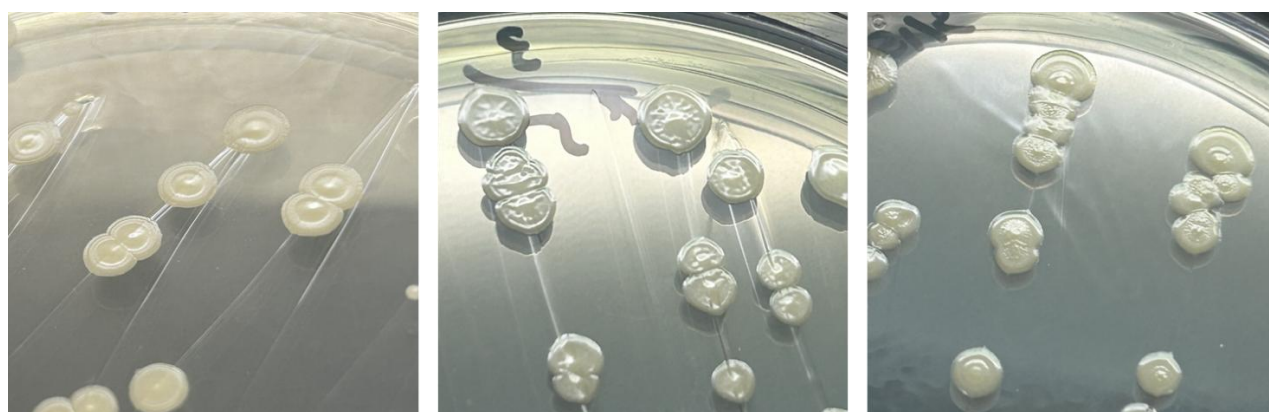
挑選出不會造成作物生長不良影響及在含有鹽類水溶液中表現較好之菌種 10、2-1、2-2、3-1 共四株，經過 *16S rDNA* 定序分析，確定 10、2-1、2-2 此三株菌株為 *Priestia megaterium*，而 3-1 為 *Bacillus amyloliquefaciens*。

文獻中顯示 *B. amyloliquefaciens* 能增進土壤養分利用效率，包括提高氮素的可用性、溶解無機與有機磷酸鹽、釋放難溶性鉀，以及生成鐵載體（siderophores）整合三價鐵離子（ Fe^{3+} ），從而提升植物的養分吸收。其次，*B. amyloliquefaciens* 能分泌植物激素與揮發性有機化合物（volatile organic compounds, VOCs），促進植物細胞生長，強化根系發展（Luo et al, 2022）。*B. amyloliquefaciens* 還能透過與病原菌競爭資源、分泌抗菌代謝物，如環狀脂肽（cyclic lipopeptides）、聚酮類化合物（polyketides），並誘導植物的系統性抗性（induced systemic resistance, ISR），增強植物對生物性壓力的抵抗力（Chowdhury et al, 2015）。此外，另有研究顯示在 200 mM NaCl 的條件下 *B. amyloliquefaciens* 會分泌特殊的蛋白質，除了能增進植物對高鹽濃度的耐受性，其中部分蛋白質還具有促進植物生長的潛力（Naamala et al, 2023）。

考量到 *B. amyloliquefaciens* 在過去已經過豐富的研究，且本研究希望結果能直接應用於田間，而菌株 3-1 (*B. amyloliquefaciens*) 在未分離時表現了透化圈（圖七），如同以上文獻所說，對其他微生物具有拮抗性，使用於環境可能排擠其他微生物，有影響原本環境中菌相的風險，並非本研究所期望的效果，因此本研究選擇 *P. megaterium* 的三株菌株（圖八）做為抗逆境研究的主要菌株。



圖七、初步分離時菌株 3-1 可見到菌落與其周圍之透化圈，右圖為放大圖。（第一作者自行拍攝）



圖八、左、中、右分別為菌株 10、2-1、2-2 於 Nutrient Agar 培養基之菌落型態。（第一作者自行拍攝）

(三) 對挑選出的菌株進行逆境測試

1. 高溫測試

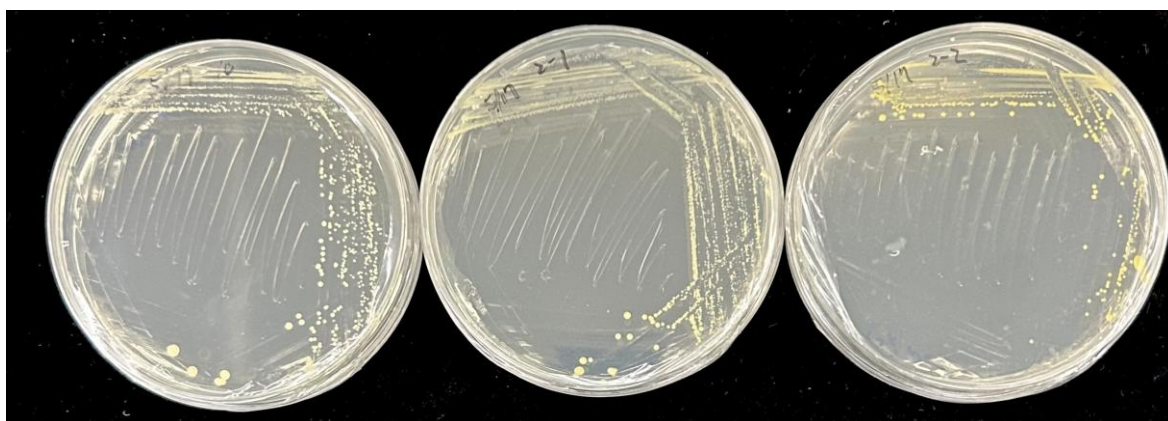
菌株 10、2-1、2-2 在 40°C、45°C 的環境皆正常生長。至 50°C 時菌株 10、2-1 進入靜菌狀態，5 天後恢復 28°C 常溫可再次正常生長。而菌株 2-2 在恢復常溫後仍未長出菌落（圖九），應無法生存於 50°C 的環境。



圖九、左、中、右分別為菌株 10、2-1、2-2 培養於 Nutrient Agar 培養基放置 50°C 5 天後再 28°C 生長之情形。（第一作者自行拍攝）

2. NaCl 濃度測試

菌株在 3%、5%、8% NaCl 濃度生長皆正常，而 10% NaCl 濃度時，菌落雖明顯較小，但依然能維持生長（圖十）。



圖十、左、中、右分別為菌株 10、2-1、2-2 於 10%NaCl 濃度之 Nutrient Agar 培養基上生長情形。（第一作者自行拍攝）

3.水解脂質能力測試

在加有聚山梨醇酯 (polysorbate) 的培養基上，菌株 2-1 周圍有明顯的白色沉澱物，而菌株 10 周圍僅有少量沉澱，菌株 2-2 則沒有明顯沉澱物（圖十一）。依（圖十一）結果判斷，菌株 2-1 應具有產生脂質水解酶的能力，菌株 10 和 2-2 則不明顯。

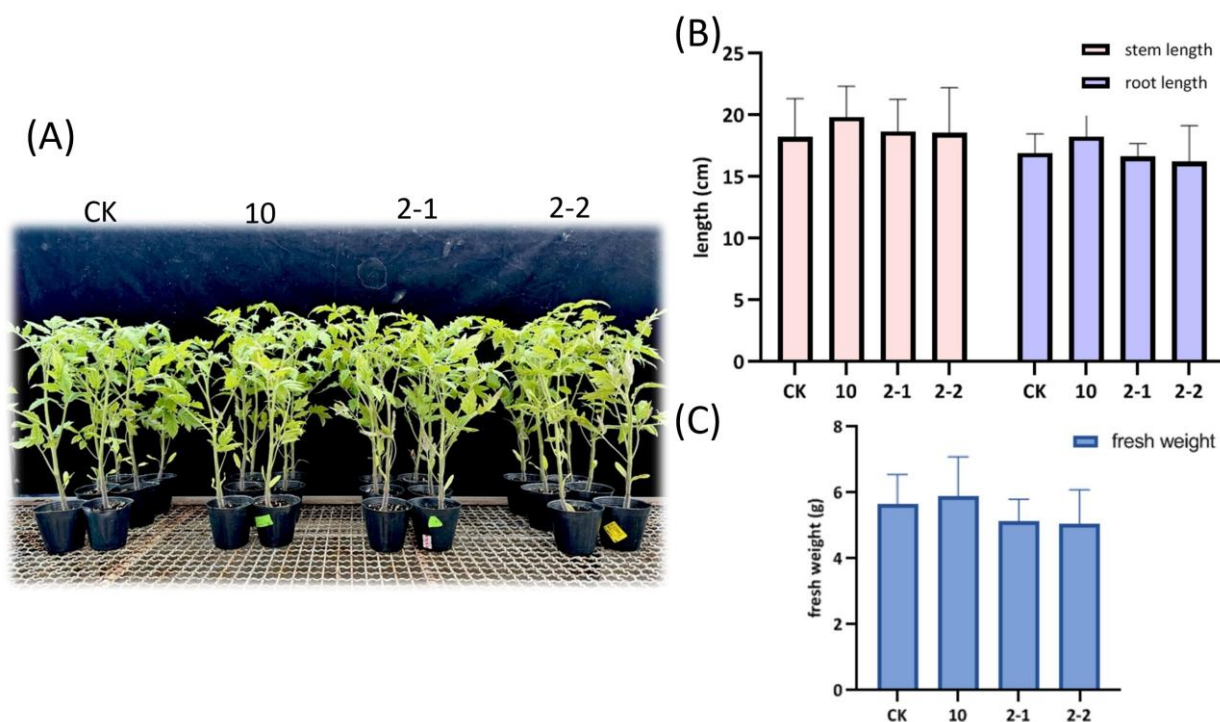


圖十一、 左、中、右分別為菌株 10、2-1、2-2 於加有聚山梨醇酯的培養基上生長情形。（第一作者自行拍攝）

二、土壤澆灌

(一) 一般條件

番茄植株在分別接種菌株 10、2-1、2-2 號 2 週後，自然成長 3 週。由（圖十二 B）全株長、根長與（圖十二 C）全株重的數據可見，在無逆境的一般條件下，接種了菌株 10、2-1、2-2 與未接種任何菌株的對照組沒有明顯生長差異。



圖十二、番茄苗接種三株 *Priestia megaterium* 之結果。(A) 為生長情形，(B) 為根長與莖長 (cm)，(C) 為植株之鮮重 (g)。(第一作者自行拍攝)

(二) 高溫逆境

番茄植株分別接種菌株 10、2-1、2-2 號 2 週後，放置於夏季無溫控的溫室環境成長 3 週後收取植株生長相關數據，菌株處理組與對照組的生長數據，經由統計後並無任何顯著差異。

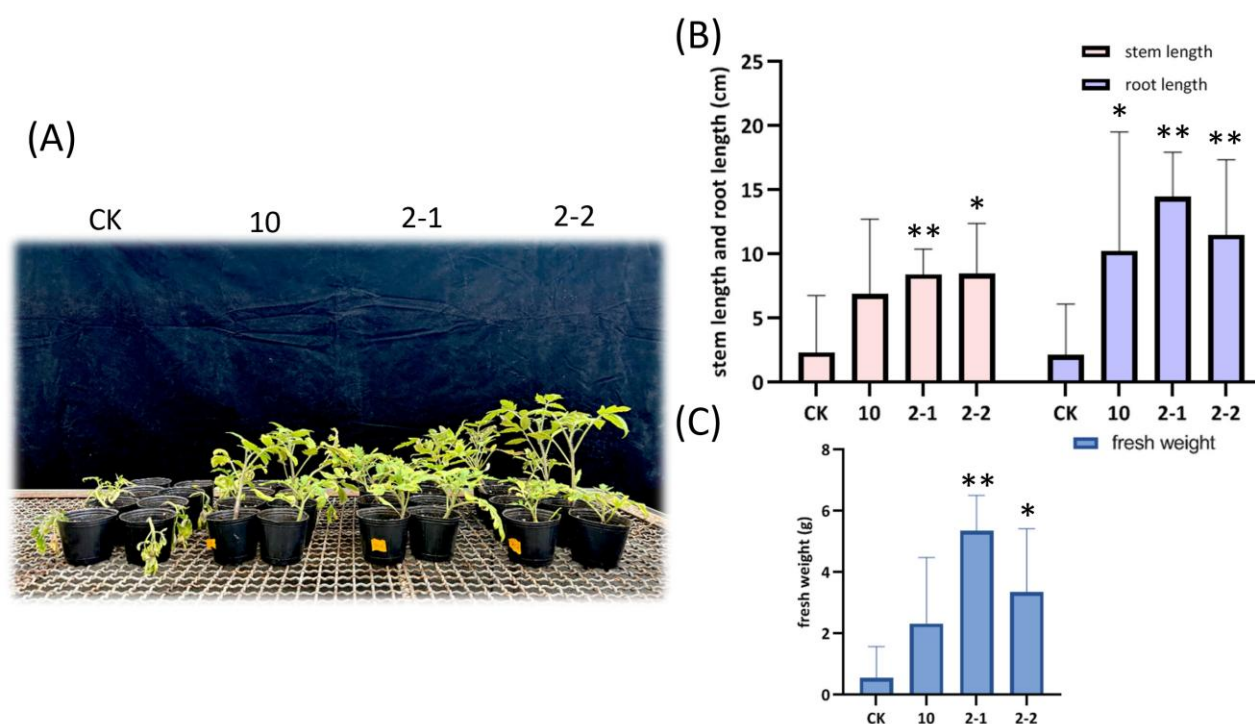
(三) 乾旱逆境

番茄植株分別接種菌株 10、2-1、2-2 號 3 週後，於溫室中停止澆水後，持續觀察 10 天，缺水時菌株處理組與對照組無明顯差異，恢復供水 1 週後收取植株，菌株處理組與對照組的生長數據，經由統計後並無任何顯著差異。

(四) 高鹽逆境

移盆至黑色塑膠軟盆一週後初次澆灌食鹽水溶液，約 2~3 天後，對照組即呈現倒伏狀。三週後部分番茄植株死亡（圖十三 A），則死亡該株的各項生長數據皆以 0 計算，全株長、根長與全株重數據如（圖十三 B）與（圖十三 C），可見實驗組 2-1 與 2-2 的植株表現明顯優於對照組與實驗組 10。具體來看，2-1 組和 2-2 組的莖長和根長差異具有統計學意義（Student *t*-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ），而實驗組 10 僅稍稍高於對照組，但未達顯著水準。

在鮮重的測量中（圖十三 C），同樣顯示處理組 2-1 的表現最佳，其植株鮮重達到約 6.5 g，而 2-2 組以約 5.5 g 居次。相較之下，處理組 10 的鮮重僅約為 2 g，而對照組最低，不足 1 g。三次重複實驗的數據皆呈現了同樣的趨勢，這些結果表明，實驗組 2-1 和 2-2 能顯著提高植株對鹽逆境的耐受性，並促進其生長。



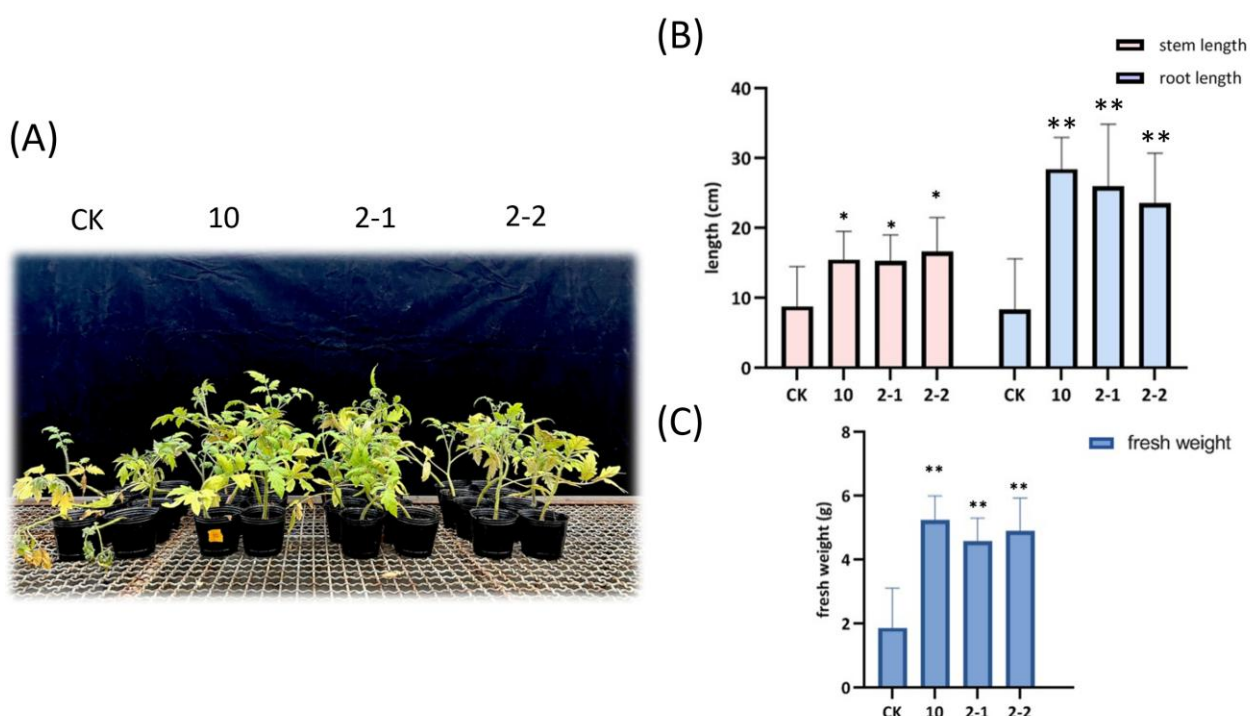
圖十三、番茄苗處理 *Priestia megaterium* 菌株後澆灌高鹽溶液之結果。(A) 為生長情形，(B) 為根長與莖長 (cm)，(C) 為植株之鮮重 (g)。Student *t*-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。(第一作者自行拍攝)

(五) 油污汙染逆境

開始每週澆灌工廠機械廢油 10 mL 一次的三週後，部分番茄植株死亡（圖十四 A），則死亡該株的各項生長數據皆以 0 計算，全株長、根長與鮮重、根重數據如（圖十四 B）與（圖十四 C），可見不同處理組的番茄植株生長狀態和數據顯示顯著差異。

從全株長度的數據來看（圖十四 B），實驗組的三株菌株根長與莖長皆明顯優於對照組，且具有統計學意義（Student *t*-test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ ）表現出較強的耐受性和生長優勢。相對而言，廢棄機械油污對照組的生長有較大抑制作用，實驗組的三株菌株處理提高番茄對油污汙染的耐受能力，促進了植物的生長。

在鮮重測量也表現出了顯著差異（Student *t*-test, $**p < 0.01$ ），且由（圖十四 A）可見對照組的番茄苗明顯表現出葉片萎凋、黃化，甚至部分植株出現死亡跡象。而經過菌株處理的番茄苗，整體葉片的顏色較為健康，植株直立，生長狀態明顯優於對照組。



圖十四、番茄苗處理 *Priestia megaterium* 菌株後澆灌廢棄機械油污之結果。(A) 為生長情形，(B) 為根長與莖長 (cm)，(C) 為植株之鮮重 (g)。Student *t*-test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。(第一作者自行拍攝)

（六）淹水逆境

番茄苗持續澆灌菌株 3 週後放入塑膠盆進行淹水處理，生長 3 週後番茄之生長相關數據。實驗過程中番茄苗除了根系生長較一般環境茂盛，其餘莖和葉的部分皆正常生長與如同一般環境生長，淹水環境應對蕃茄沒有太大影響。結果顯示對照組與實驗處理組，在生長相關數據上並未有顯著差異。

三、抗逆境物質分析

（一）以去除菌體所得的濾液浸泡番茄苗

番茄苗浸泡在含有 40mL 的純水、200 mM 之 500 μ L NaCl 和 3mL 去除了菌體之濾液的水溶液結果如（圖十五），在放置 7 天後可明顯觀察到對照組（CK）及實驗組菌株 10 號的番茄苗植株葉片萎縮，部分葉片呈現黃化與失水的狀態。而實驗組菌株 2-1 號的番茄苗在 7 天後仍維持較佳的生長狀態，葉片較為挺立且無黃化。



圖十五、番茄苗浸泡添加濾液的 NaCl 水溶液 7 天生長情形。（第一作者自行拍攝）

（二）以分提濾液浸泡番茄苗

2-1 號組為去除菌體所得的濾液和 NaCl 水溶液，對照組 (CK) 為添加無菌株的培養液和 NaCl 的水溶液。其餘實驗組則是添加使用 C18 逆相層析管柱，以純水和甲醇將濾液分提成六管，分別為極性較高而溶於水層的 Flow，與極性較弱以甲醇分段提出的 E1、E2、E3、E4、E5。水溶液以 40mL 的純水和 200 mM 之 500 μ L NaCl 水溶液配成，分別加入 1mL 2-1 號濾液、flow、E1、E2、E3、E4、E5。將番茄苗浸泡水溶液 7 天後如（圖十六），由（圖十六）可見其中以 E3 效果最佳。目前已送質譜儀進行進一步分析。



圖十六、番茄苗浸泡添加分提後濾液的 NaCl 水溶液 7 天生長情形。

（第一作者自行拍攝）

伍、討論

本次研究所分離之 *Priestia megaterium* 三種菌株，過去研究中已有發現 *P. megaterium* 菌株可使植物對乾旱耐受性增加的 (Hwang et al, 2022)，而除了乾旱逆境之外，許多研究中提到了受油汙污染的土壤可能因有機碳含量、總石油碳氫化合物 (TPH)、碳氮比 (C/N)、可溶鹽含量等變化，影響植物的生長能力 (Marinescu et al, 2011)，微生物可能是解決油汙污染影響的解方，在受油汙污染的土地加入植物生長促進菌 (Plant Growth promoting Bacterium, PGPB) 後，植物生長改善，植物和微生物的聯合作用能有效減少有機污染物，特別是根區降解過程有助於污染物降解並顯著減少污染 (Franchi et al, 2022)，或是面對農田遭受雨水減

少且肥料濫用造成之土壤鹽化等問題，在本研究中成功找到了能夠提升番茄苗對高鹽度環境與廢棄機械油污環境耐受性的菌株。

另外，菌株 10 和 2-2 號在脂質水解測試的結果中雖表現出脂質水解酶，仍在機械廢油污染的土壤澆灌實驗中展現了改善生長狀態的效果，在其他研究中則表明分解複雜油污類型的酵素，可能為其他種酵素，因此推測 10 和 2-2 菌株可能具有 alpha/beta hydrolase 或 esterase 等此類型協助分解芳香族苯環酯類的酵素，這在許多生物分解者（Biodegradation）亦常產生這些酵素進行海洋油污的分解（Tedesco et al, 2024）。而我們也於 NCBI 查詢了 *P. megaterium* 等發表基因體的菌株中發現，*P. megaterium* 確實具有合成 alpha/beta hydrolase 和 esterase 的基因，未來可進行此酵素分泌的測試。

在本研究初步測試中，也發現了含有生長代謝物而去除了菌體的濾液仍可使番茄苗抵抗高鹽度逆境。*P. megaterium* 菌株使植株增加對逆境可能是透過菌株生長時的分泌物，希望能進一步找到 *P. megaterium* 菌株分泌出的物質，未來得以有應用於田間的潛力。

陸、結論

- 一、*P. megaterium* 10、2-1 與 2-2 菌株本身即對惡劣環境具有較高抗性，均能在含 10% NaCl 培養基上生長，*P. megaterium* 10 與 2-1 菌株能夠存活於 50°C 的高溫環境。
- 二、*P. megaterium* 2-1 與 2-2 菌株在高鹽逆境條件下，番茄植株的全株長度和鮮重方面均顯著優於其他組別，顯示此菌株在增強植株耐鹽性方面具有應用價值。
- 三、*P. megaterium* 2-1 與 2-2 菌株在機械廢油污染環境下能促進番茄植株根系生長，增加對油污染逆境的耐受性，具有潛在應用價值。
- 四、在去除了菌體的濾液中應含有能增強番茄植株耐鹽性的物質，初步推測為菌株之生長代謝物，目前已進一步分析具有抗逆境潛力的物質。

柒、參考文獻資料

- Bach, E., Seger, G. D. S., Fernandes, G. C., Lisboa, B. B., & Passaglia, L. M. P. (2016, March). Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0929139315301189>
- Biedendieck, R., Knuuti, T., Moore, S. J., & Jahn, D. (2021, July 15). The “beauty in the beast” —the multiple uses of *Priestia megaterium* in biotechnology. PMC. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8390425/>
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. frontier. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2015.00780/full>

Franchi, E., et al. (2022). Nature-based solutions for restoring an agricultural area contaminated by an oil spill. MDPI. <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/17/2250>

Haskett, T. L., Tkacz, A., & Poole, P. S. (2020, November23). Engineering rhizobacteria for sustainable agriculture. Oxford Academic. <https://academic.oup.com/ismej/article/15/4/949/7474442>

Hwang, H., et al. (2022, October 17). A plant endophytic bacterium *Priestia megaterium* strain BP-R2 isolated from the halophyte *Bolboschoenus planiculmis* enhances plant growth under salt and drought stresses. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36296323/>

Hwang, H., et al. (2021, August 10). A Plant Endophytic Bacterium, *Burkholderia seminalis* Strain 869T2, Promotes Plant Growth in *Arabidopsis*, Pak Choi, Chinese Amaranth, Lettuces, and Other Vegetables. MDPI. <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/8/1703>

Hung, S. W., Chiu, M., Huang, C., & Kuo, C. (2022, August). Complete genome sequence of *Curtobacterium* sp. C1, a beneficial endophyte with the potential for in-plant salinity stress alleviation. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35819348/>

Hung, S. W., et al. (2023, March 24). Endophytic biostimulants for smart agriculture: *Burkholderia seminalis* 869T2 benefits heading leafy vegetables in-Field management in Taiwan. MDPI. <https://www.mdpi.com/2073-4395/13/4/967>

Kumar, D. et al. (2012). Isolation, production and application of lipase/esterase from *Bacillus* sp. strain DVL43. Scholars Research Library. https://www.researchgate.net/profile/Dr-Sushil-Nagar/publication/235919129_Isolation_production_and_application_of_lipaseesterase_from_Bacillus_sp_strain_DVL43/data/65821e1f0bb2c7472bf88972/ARTICLE-12.pdf

Luo, L., Zhao, C., Wang, E., Raza, A., & Yin, C. (2022, June). *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501322000568>

Mahmoud, F. M. et al. (2024, June 25). Comparative genomic analysis of strain *Priestia megaterium* B1 reveals conserved potential for adaptation to endophytism and plant growth promotion. Microbiology Spectrum. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/spectrum.00422-24>

Marinescu, M., et al. (2010). An assessment of the effects of crude oil pollution on soil properties. AFST. https://www.researchgate.net/profile/Mariana-Marinescu/publication/49613880_AN_ASSESSMENT_OF_THE_EFFECTS_OF_CRUDE_OIL_POLLUTION_ON_SOIL_PROPERTIES/links/0f317530f0ea9bcd30000000/AN-ASSESSMENT-OF-THE-EFFECTS-OF-CRUDE-OIL-POLLUTION-ON-SOIL-PROPERTIES.pdf

Naamala, J., Subramanian, S., Msimbira, L. A., & Smith, D. L. (2023, August 28). Effect of NaCl stress on exoproteome profiles of *Bacillus amyloliquefaciens* EB2003A and *Lactobacillus helveticus* EL2006H. PMC. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10493332/>

Tedesco, P., et al. (2024, March). Bioremediation for the recovery of oil polluted marine environment, opportunities and challenges approaching the Blue Growth. ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X24001346>

Thakur, R., et al. (2024, June). Understanding the molecular mechanism of PGPR strain *Priestia megaterium* from tea rhizosphere for stress alleviation and crop growth enhancement. ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667064X24001489>

Von Tigerstrom, R. G., & Stelmaschuk, S. (1989, April). The use of Tween 20 in a sensitive turbidimetric assay of lipolytic enzymes. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2501015/>

【評語】 052108

1. 本研究之目的在由校園植物上篩選出具有能促進植物對抗逆境的潛力菌株。結果已成功從校園植物中篩選出具潛力的共生菌株 *Priestia megaterium*，進一步證實其可促進番茄苗在鹽化與油污逆境下生長，顯示其具抗逆促生能力。
2. 本研究方法簡單明確，實驗設計具應用價值，為開發益生菌提供基礎。未來若能深入探討其是否對更多植物具相同作用的分析，並探討其作用機制，將有助於強化結論及應用潛力。
3. 未來可針對其假設設計實驗分析：本研究菌株種如何改變植物抗逆境相關的酵素活性及基因表現，將可增加此研究深度。

作品海報

探索校園中有助於植物 抵抗逆境之菌株

摘要

本研究旨在校園植物上篩選出使植物對抗逆境具有潛力的菌株。首先，將校園植物葉圈與維管束內部分離出的細菌進行生理生化分析及篩選後，分離出三株對植物生長無不良影響之*Priestia megaterium*菌株。實驗結果顯示，*P. megaterium*能共生於番茄苗中，將番茄幼苗處理*P. megaterium*菌株兩週後，能協助番茄植株抵抗土壤鹽化而存活，或是當土壤環境有油污污染時亦能使植物維持生長，因此具有幫助植物抵抗不良逆境之潛力。未來則希望能更進一步探討*P. megaterium*與植物間如何相互作用而抵抗逆境。

壹、研究動機

隨著氣候變遷帶來的極端氣候事件日益頻繁，不穩定的氣候條件嚴重影響作物生長，對糧食供應安全構成威脅。為應對極端氣候對農業生產的影響，農民需投入更多資源以維持產量，甚至過度施用肥料，不僅加重農業生產成本，亦經常導致土壤退化、水源污染，造成惡性循環。

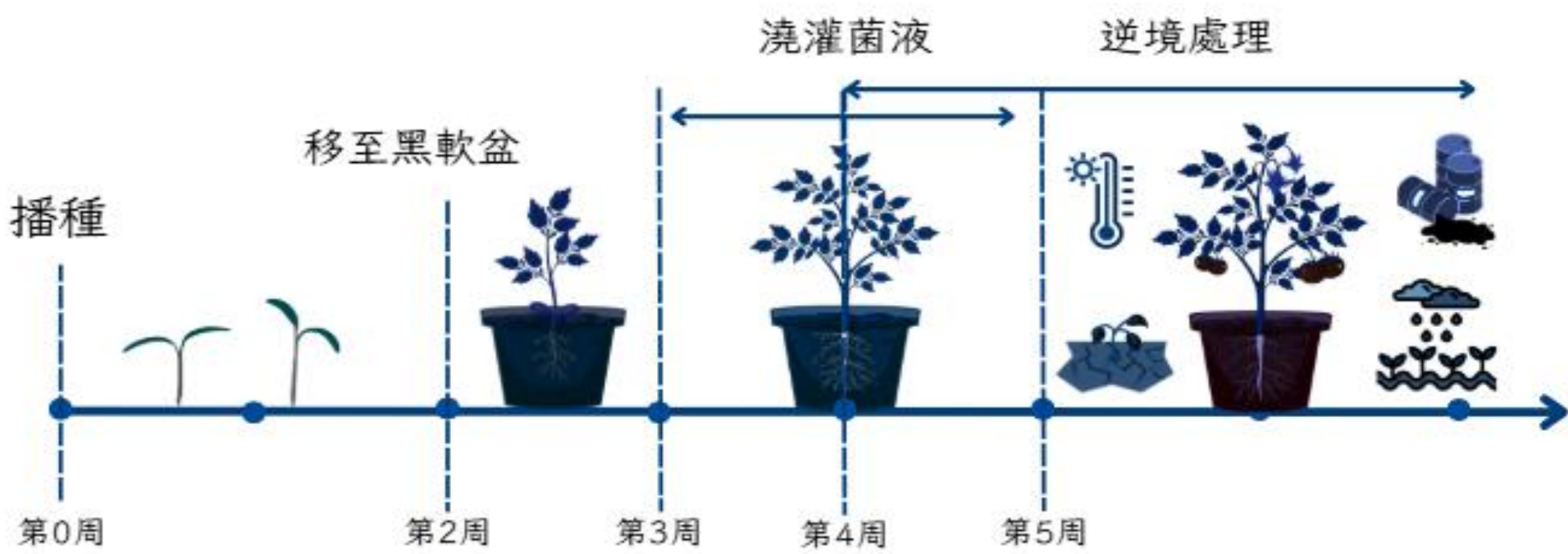
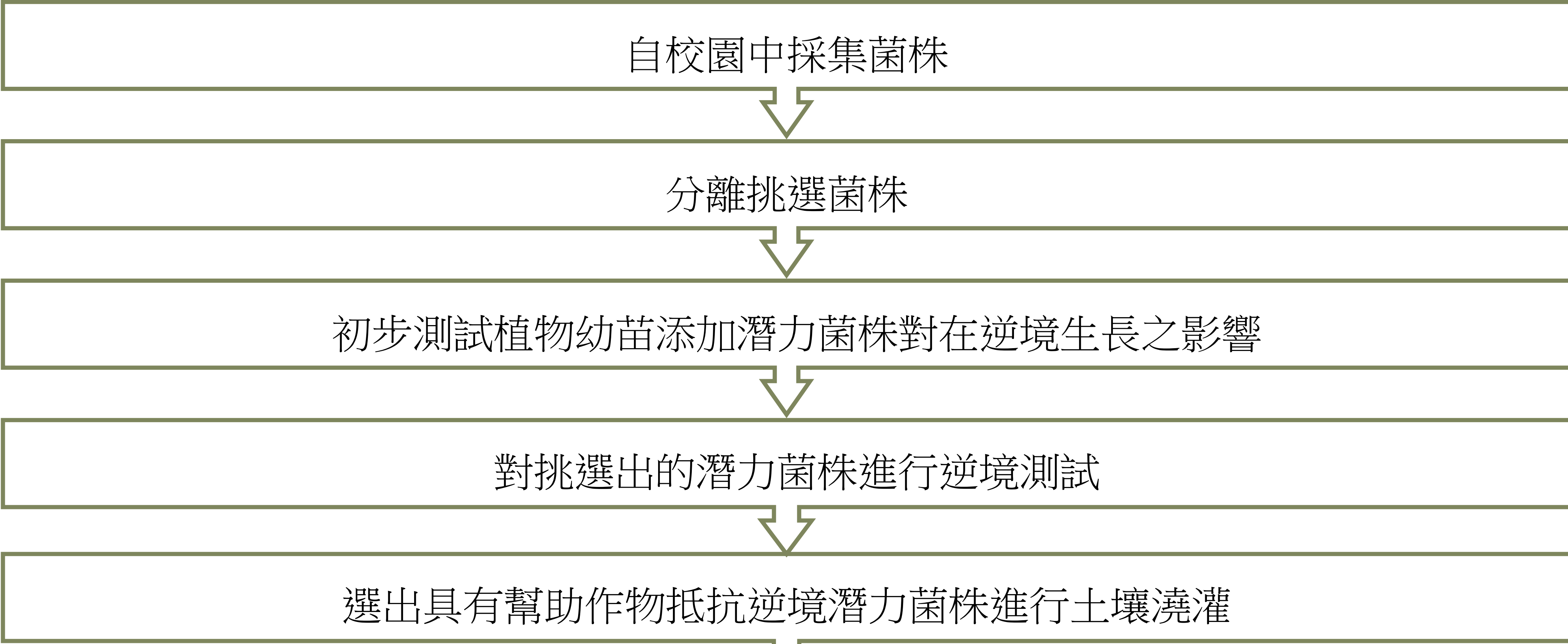
有益菌在自然界中對植物生長的調控具有潛力，可以透過增強作物的抗逆境能力，提升農業的永續性。因此，希望能尋找有益菌，提供除了基因轉殖以外，對環境低負擔、低污染的方式提升植物抗逆境能力和生長效率。

在篩選具有潛力的有益菌時，經過 16S rDNA 定序分析發現其中三株為 *Priestia megaterium* (巨大芽孢桿菌) 與一株為*Bacillus amyloliquefaciens* (液化澱粉芽孢桿菌)。過去有許多研究提出 *P. megaterium* 可能與植物共生並增強植物應對酸性、鹼性逆境的能力，故本研究選擇 *P. megaterium* 為抗逆境研究的主要菌株。

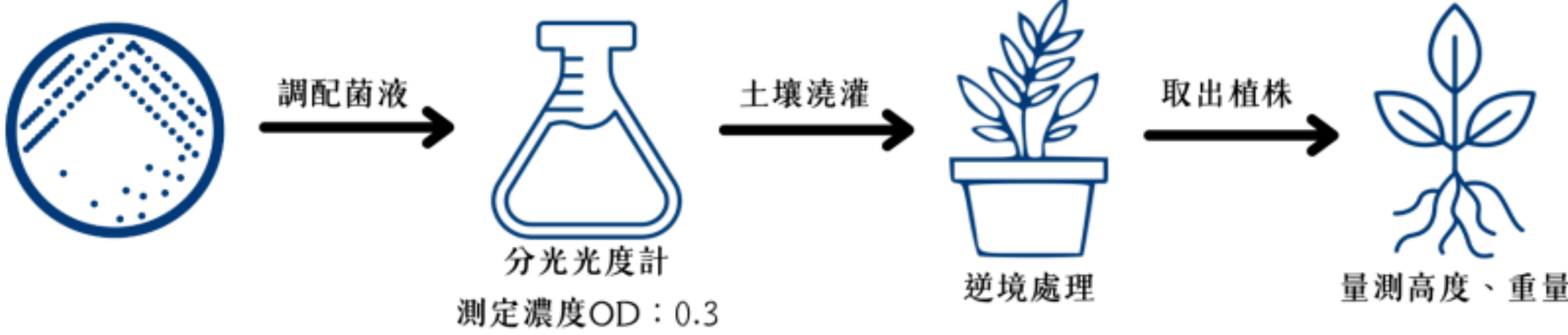
貳、研究目的

- 一、從校園植物中，篩選具有幫助植物抵抗逆境的潛力菌株。
- 二、測試澆灌了各種潛力菌株菌液的番茄苗，在不同逆境下的生長情形。
- 三、分析抗逆境潛力菌株所分泌的物質，並探討該物質使植株抵抗逆境可能的途徑。

參、研究流程



圖一、番茄苗生長與處理菌株時間序



圖二、番茄處理菌株後進行土壤澆灌實驗流程

蒐集數據，進行分析

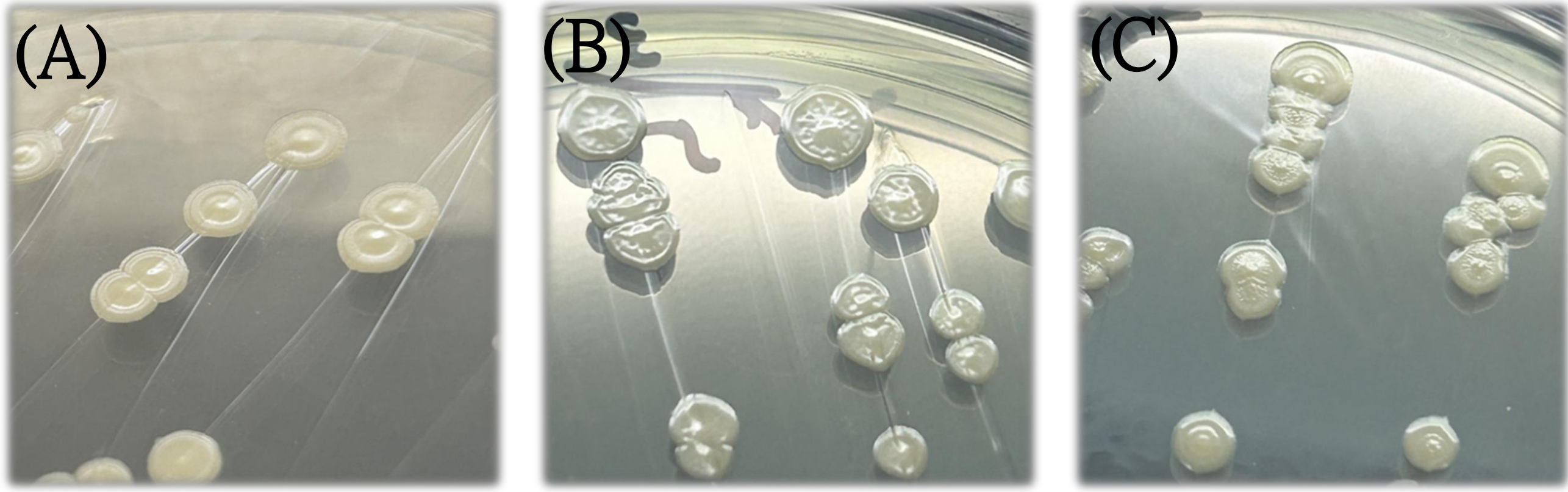
挑選潛力菌株與逆境因子處理進行抗逆境物質分析

肆、研究結果及討論

一、初篩結果 效果最佳的菌株10、2-1、2-2，經DNA定序後確定菌株為*Priestia megaterium*。

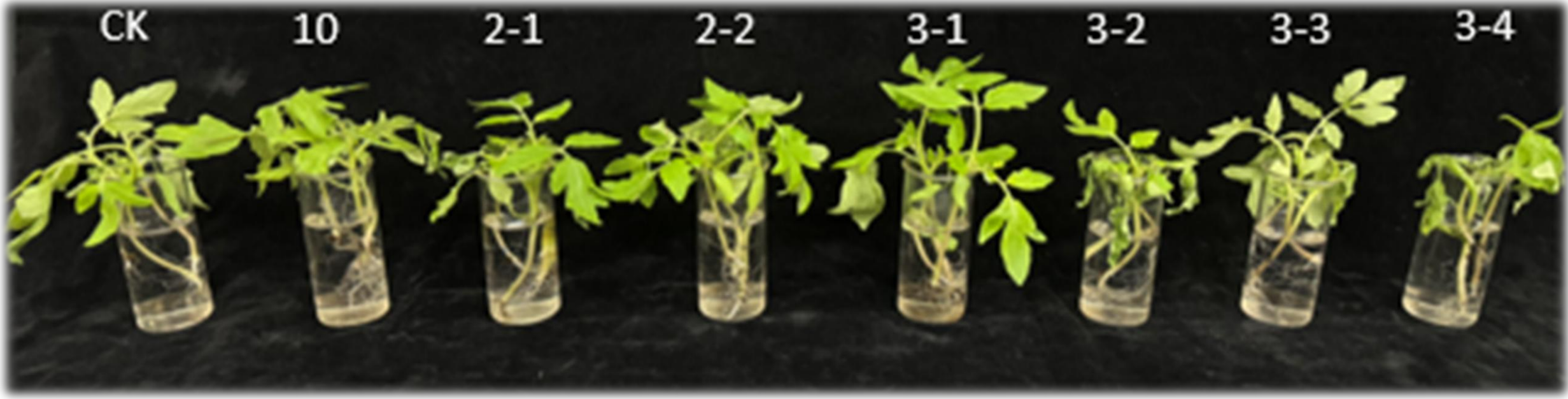


以菌落型態的不同分離與去除了重複的菌株後，得到了7株菌。依分離順序編號命名，分別為2-1、2-2、3-1、3-2、3-3、3-4和10號。



圖三、校園中採集到潛力菌株的緬梔花

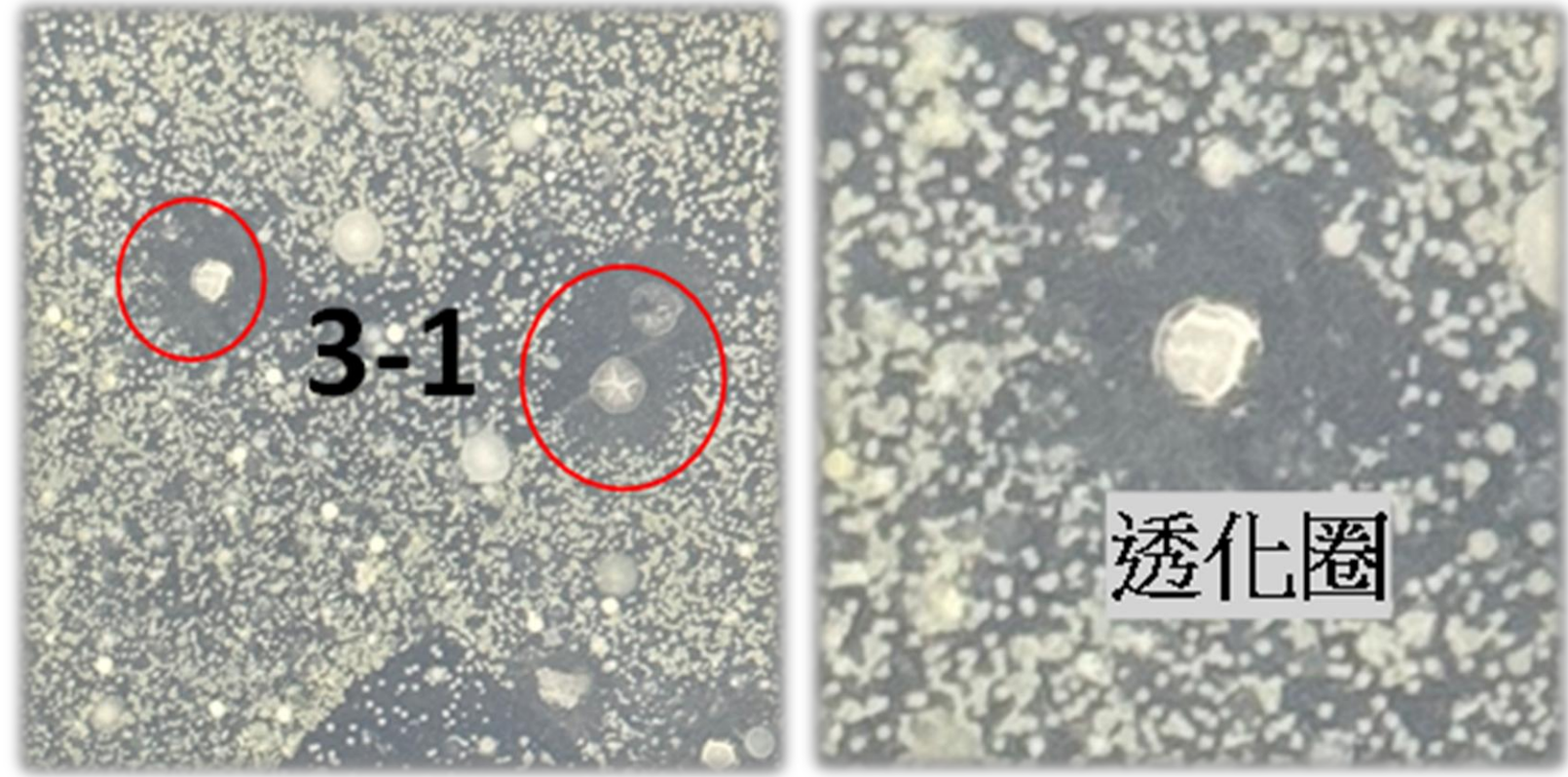
圖四、(A)、(B)、(C)分別為菌株10、2-1、2-2於NA培養基之菌落



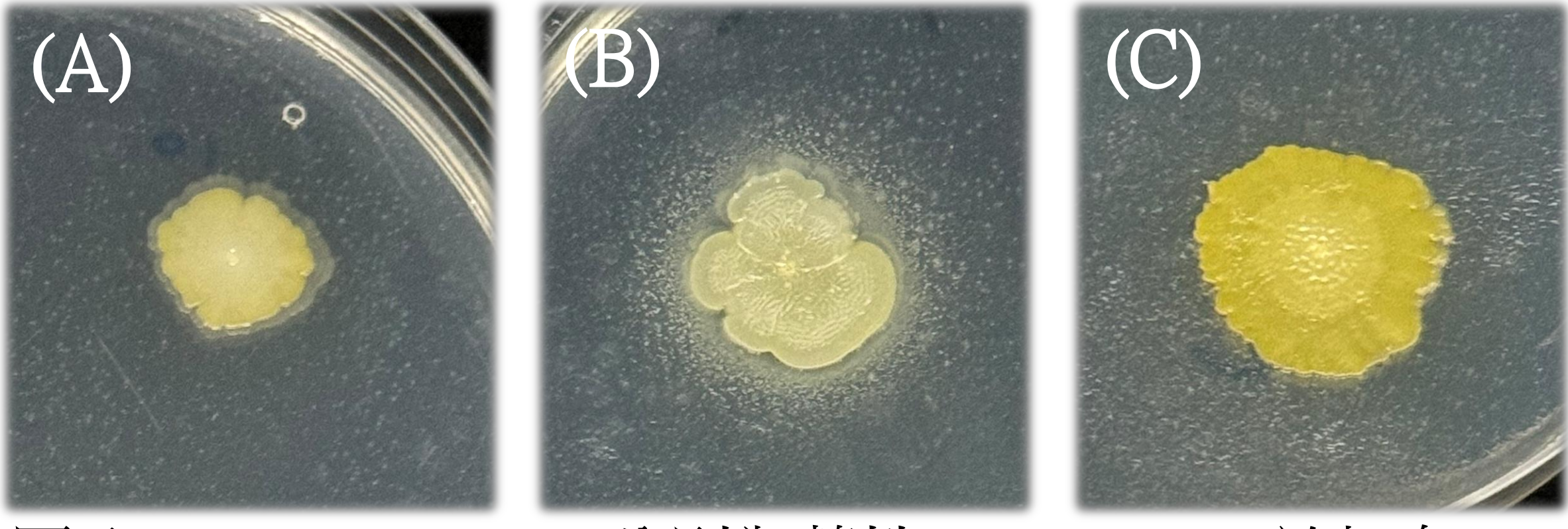
圖五、番茄苗浸泡菌液之生長結果（CK為對照組）



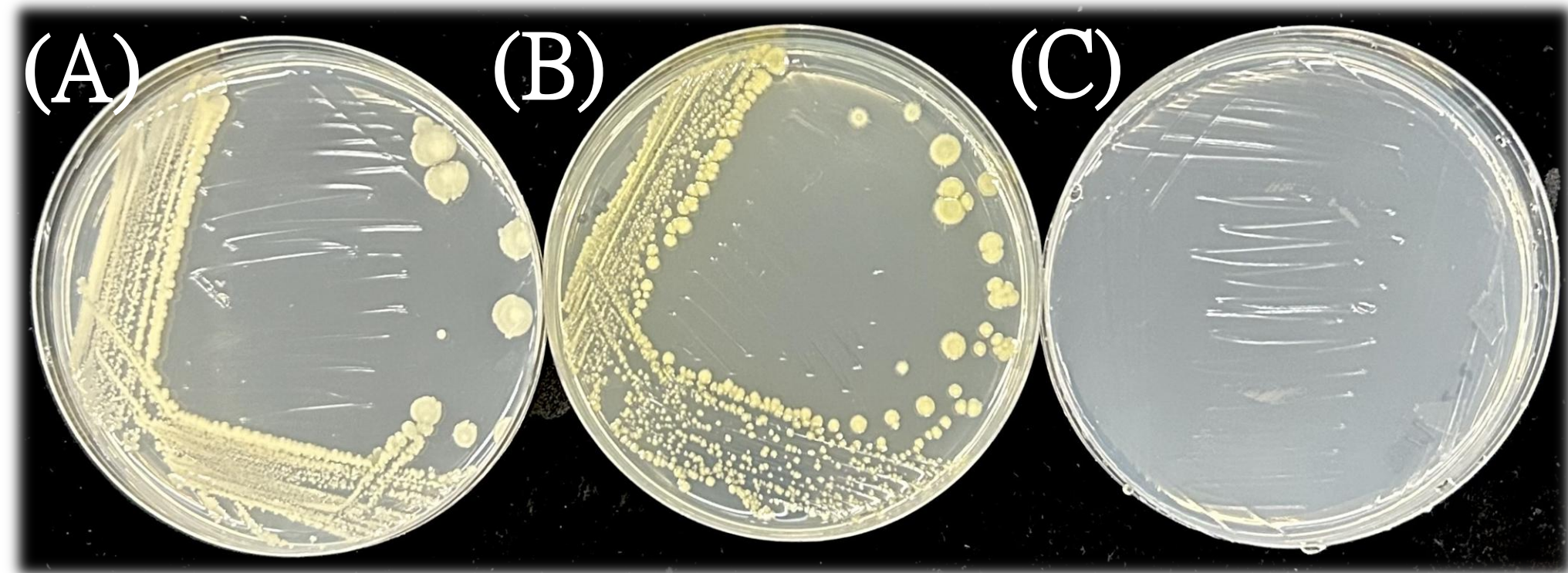
圖六、番茄苗浸泡菌液與處理高鹽之生長結果（CK為對照組）



在加有聚山梨醇酯的培養基上，菌株2-1周圍有明顯的白色沉澱物，而菌株10周圍僅有少量沉澱，菌株2-2則沒有明顯沉澱物。

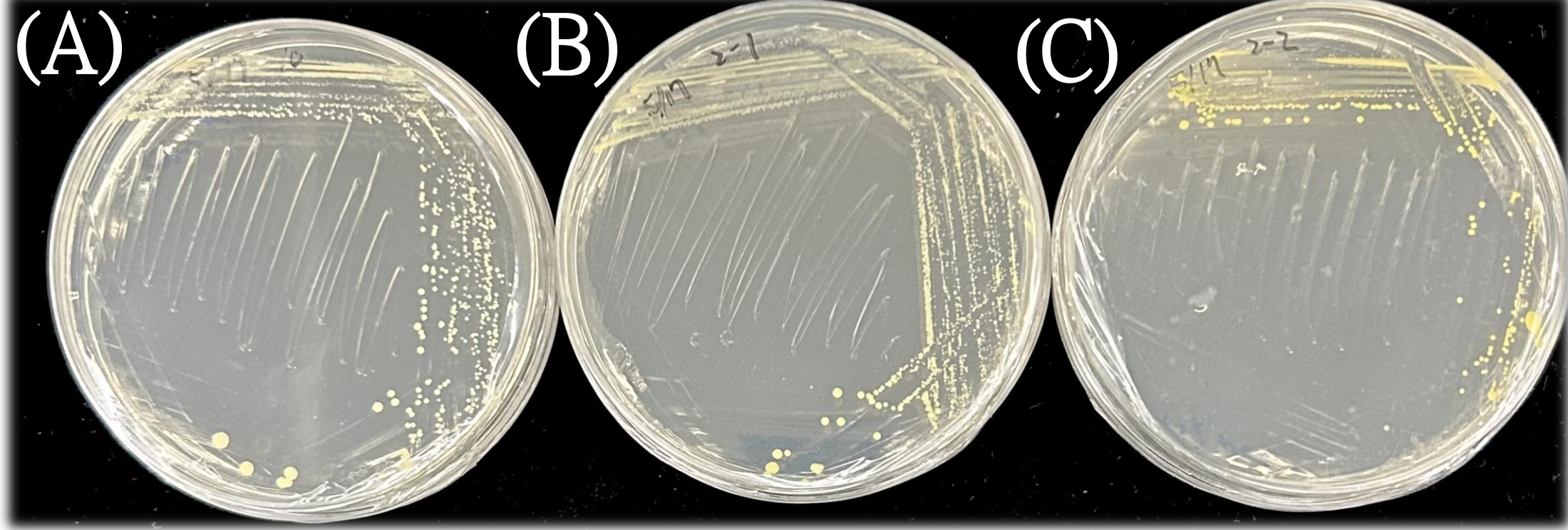


圖八、(A)、(B)、(C)分別為菌株10、2-1、2-2於加有聚山梨醇酯的培養基上生長情形。



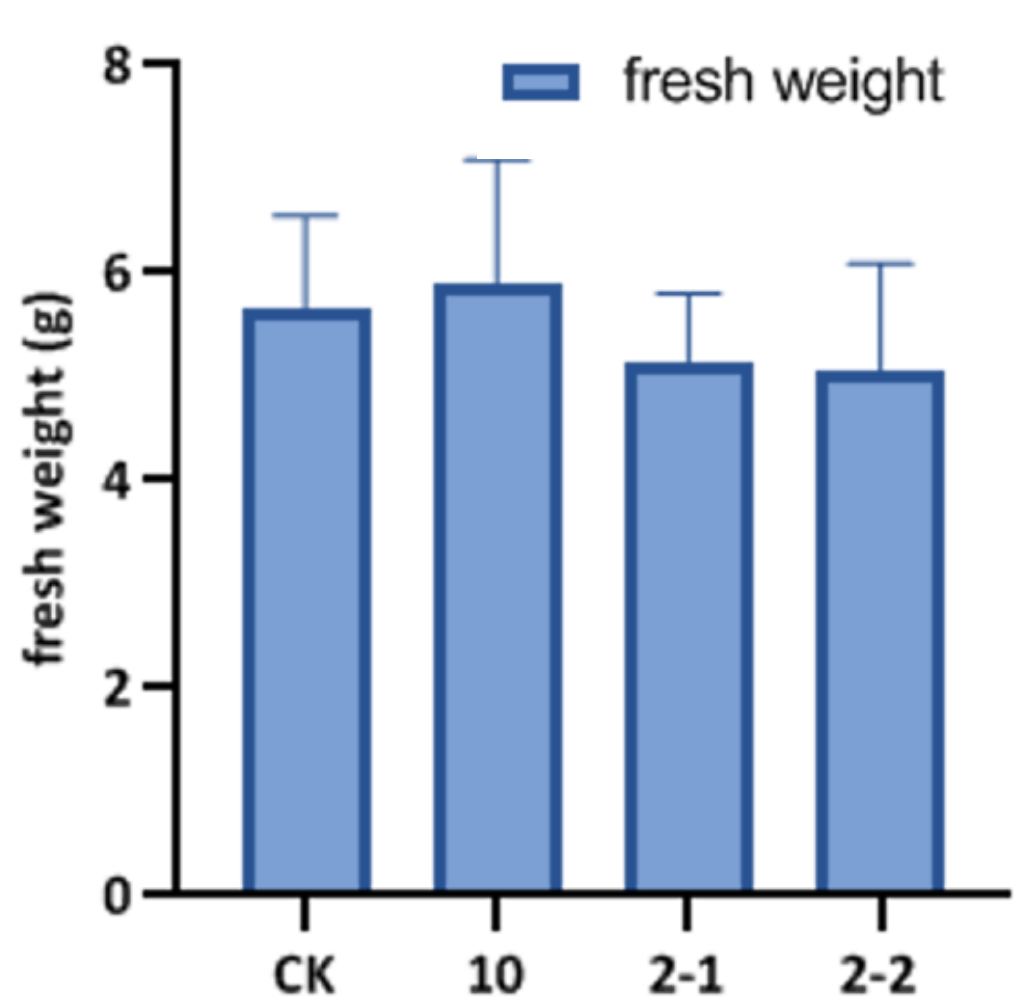
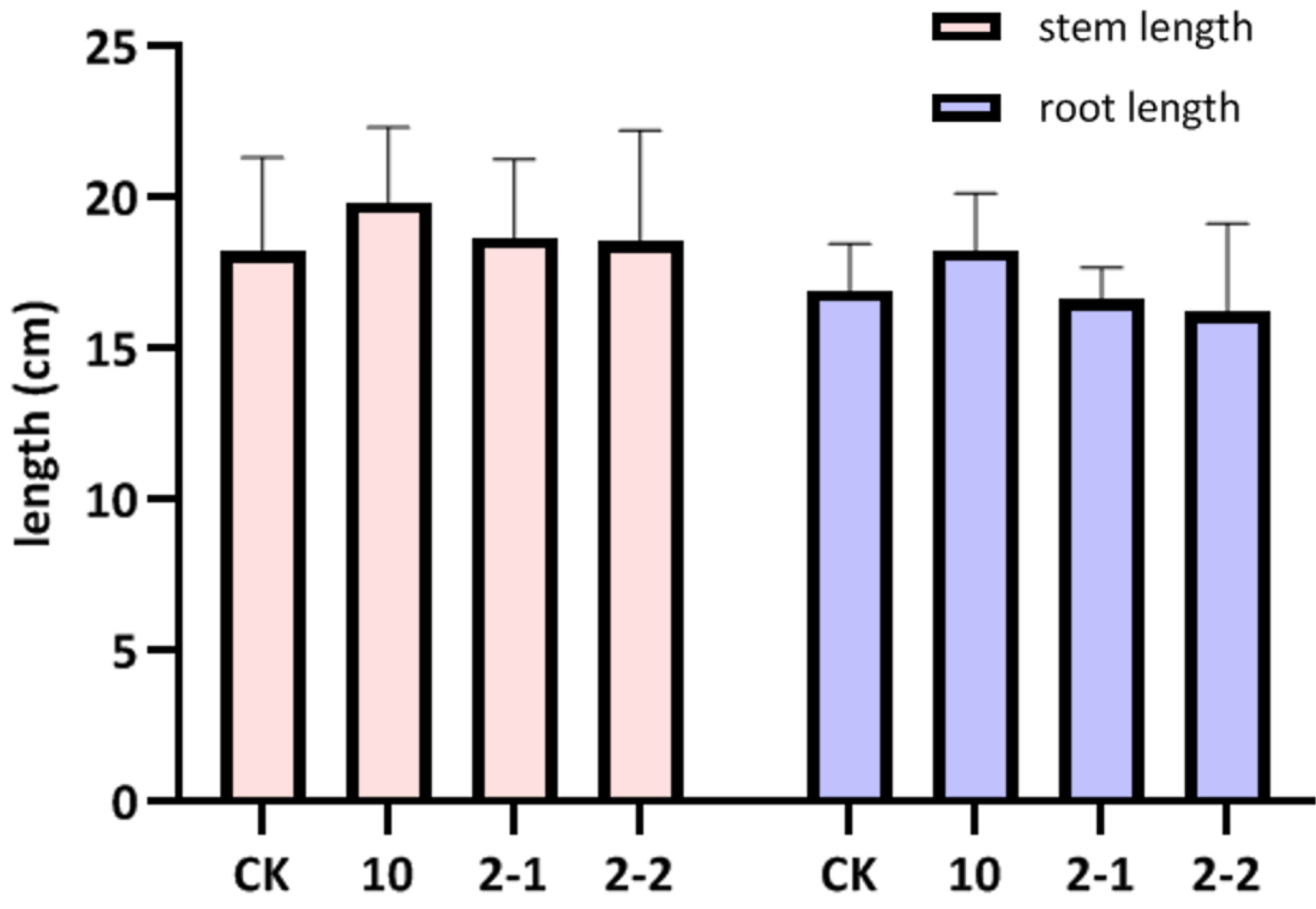
圖九、(A)、(B)、(C)分別為菌株10、2-1、2-2培養於NA培養基，放置50°C 5天後，回到28°C生長情形。

◀ 菌株10、2-1、2-2在45°C仍正常生長。50°C時菌株10、2-1進入靜菌狀態，5天後恢復28°C常溫可再次正常生長。

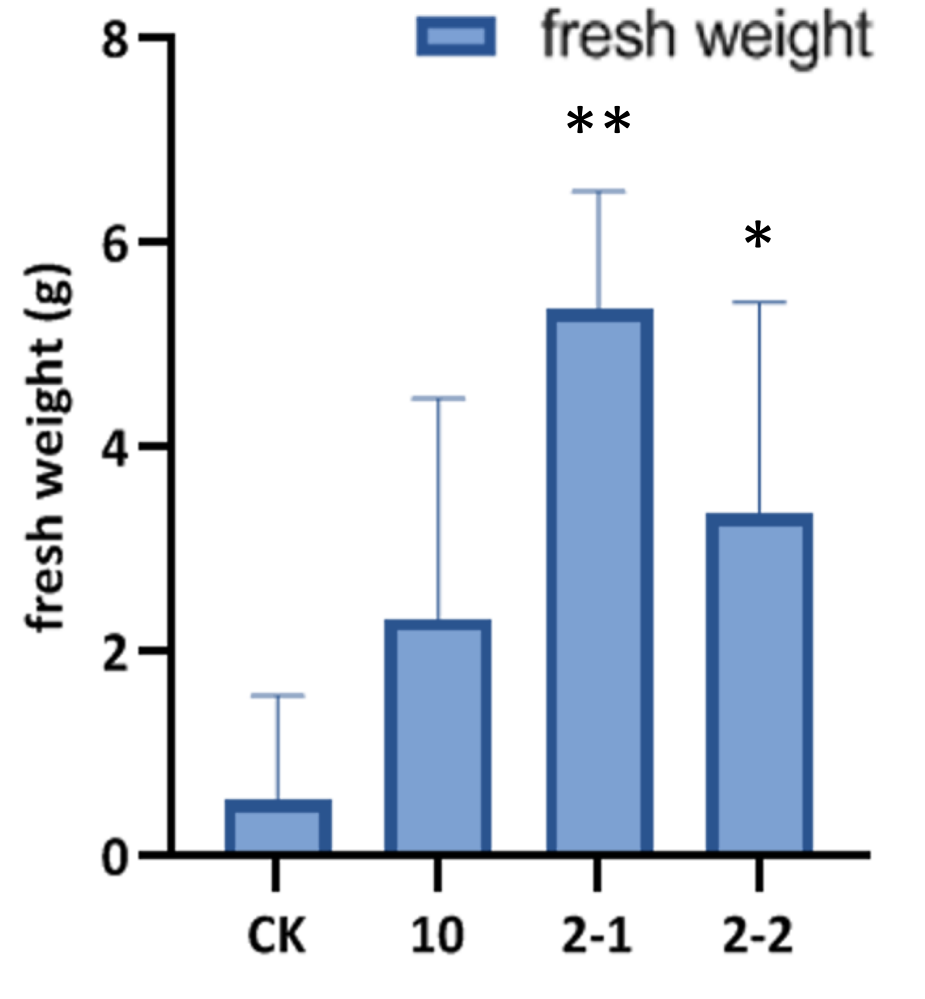
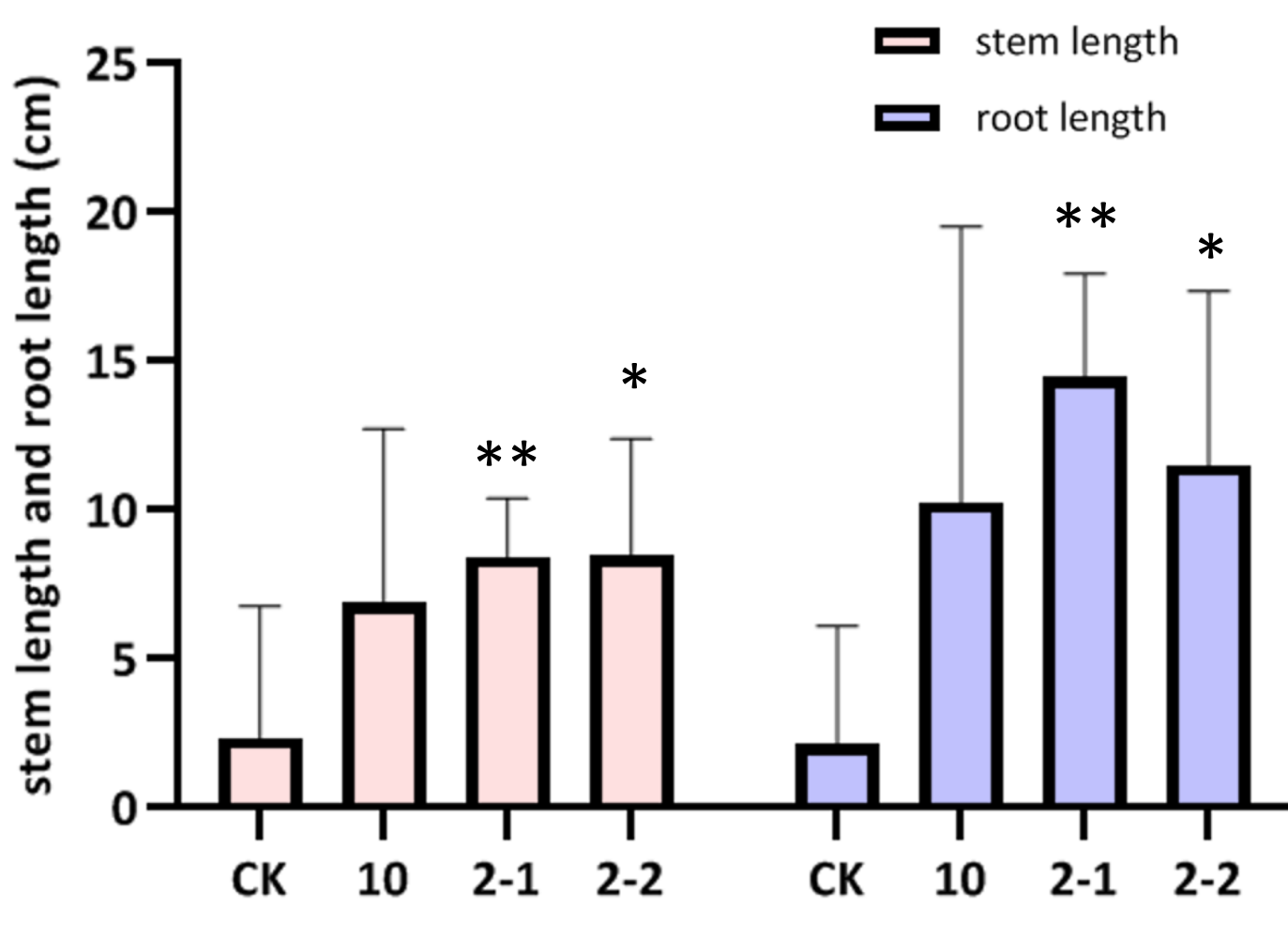


圖十、(A)、(B)、(C)分別為菌株10、2-1、2-2於10% NaCl濃度之NA培養基上生長情形。

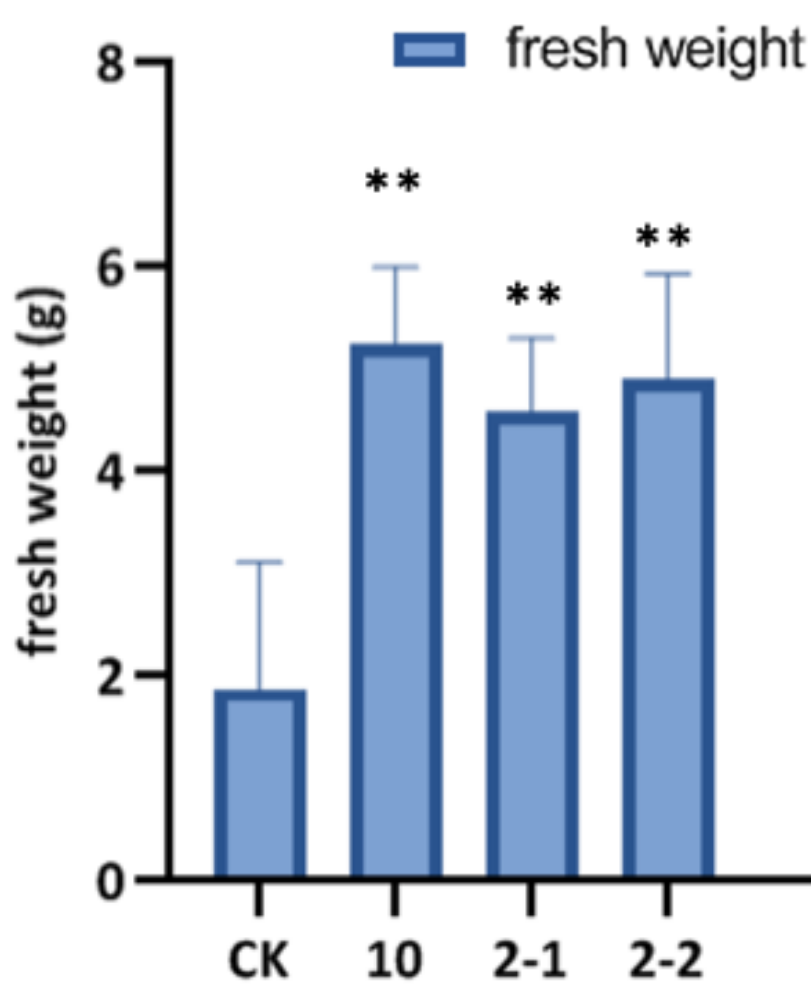
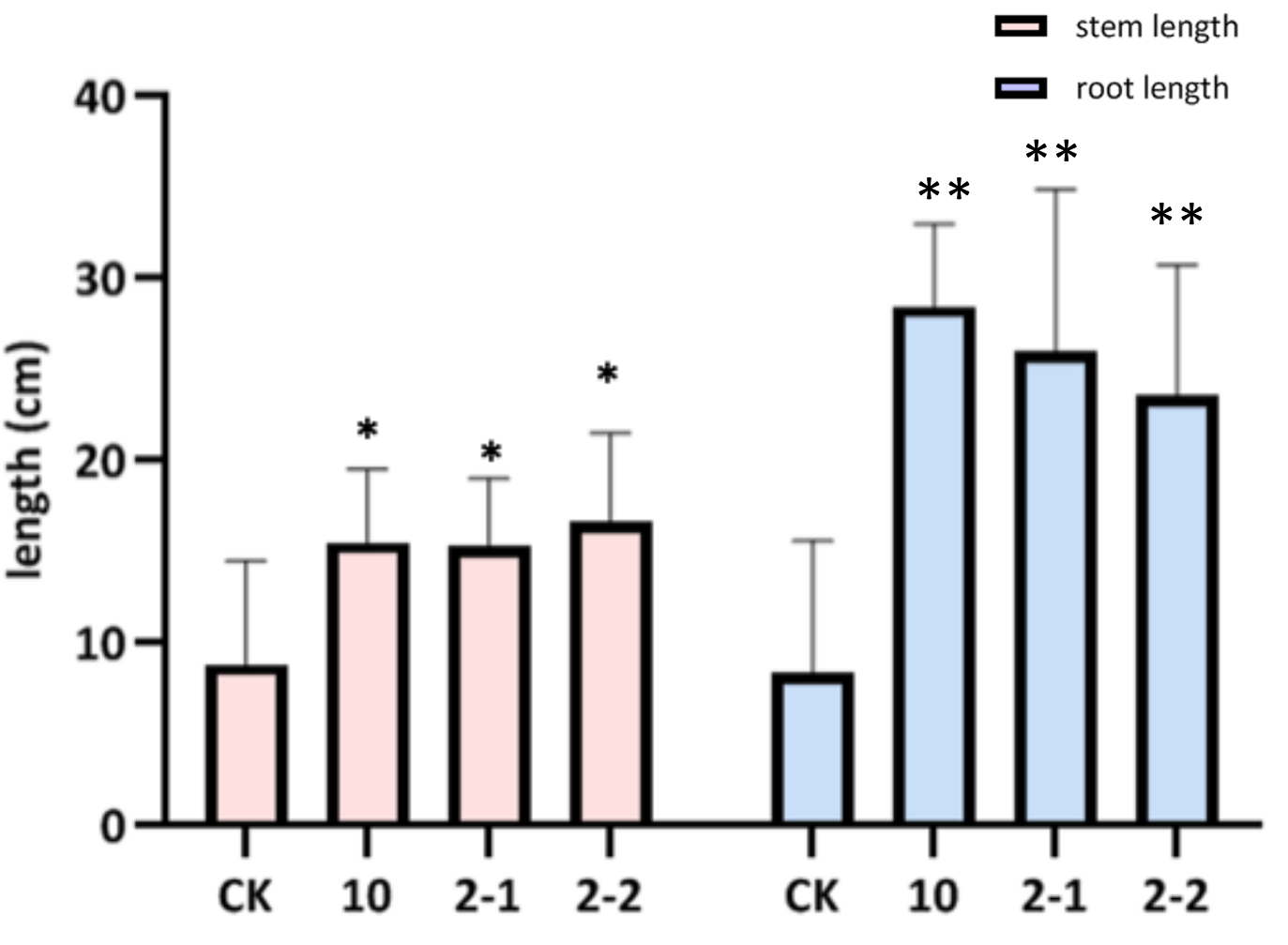
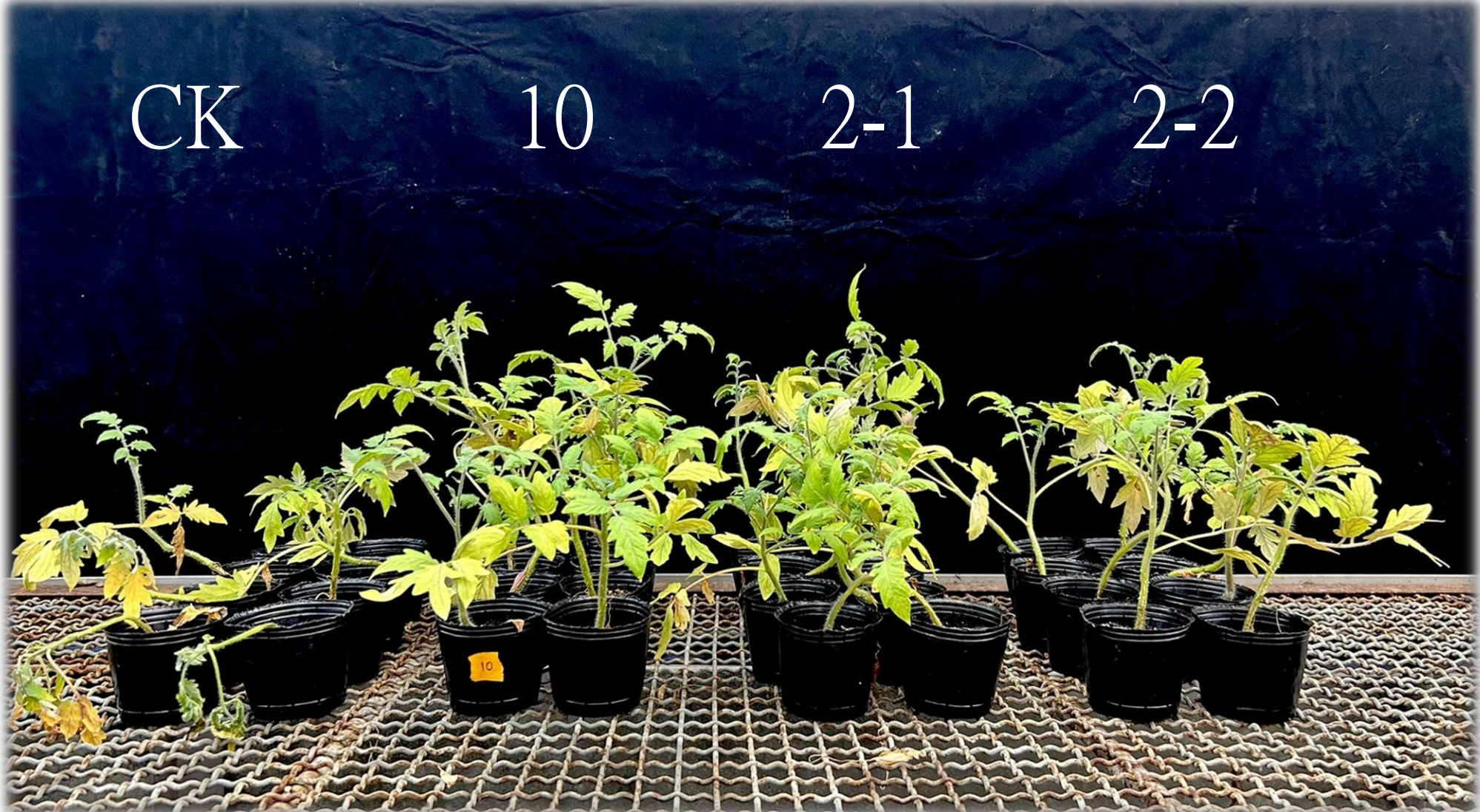
二、土壤澆灌 *P. Megaterium* 2-1、2-2菌株在高鹽逆境；10、2-1、2-2菌株在廢棄油汙下，能顯著提升番茄植株各項生長數值。



圖十一、番茄苗接種三株*P. megaterium*之生長情形和根長與莖長 (cm)、植株之鮮種 (g) 統計圖表。經統計後未有顯著差異。



圖十二、番茄苗處理*P. megaterium*菌株後澆灌高鹽溶液之生長情形和根長與莖長 (cm)、植株之鮮種 (g) 統計圖表。Student *t*-test, **p* < 0.05, ***p* < 0.01。



圖十三、番茄苗處理*P. megaterium*菌株後澆灌廢棄機械油汙之生長情形和根長與莖長 (cm) 和植株之鮮種 (g) 統計圖表。Student *t*-test, **p* < 0.05, ***p* < 0.01。

三、抗逆境物質分析

(一)以去除菌體所得的濾液浸泡番茄苗

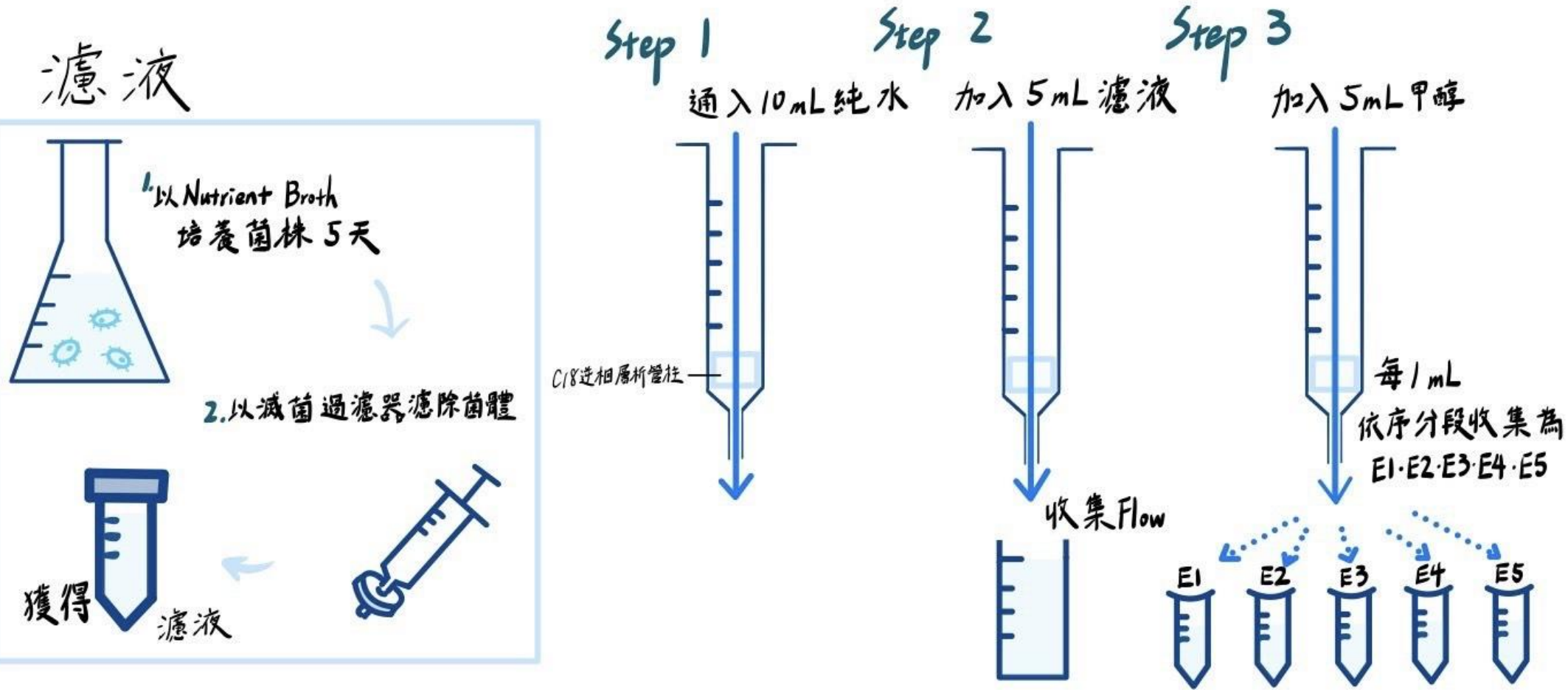


圖十四、番茄苗浸泡添加濾液的NaCl水溶液

對照組 (CK) 僅添加無菌株的培養液和NaCl的水溶液。其餘實驗組10、2-1、2-1號則是添加去除菌體所得的濾液和NaCl水溶液。

其中以2-1號菌株的濾液效果最佳。

(二)以分提濾液浸泡番茄苗



圖十五、以管柱層析分提濾液步驟



圖十六、番茄苗浸泡添加分提後濾液的NaCl水溶液

2-1號組為去除菌體所得的濾液和NaCl水溶液，對照組 (CK) 為添加無菌株的培養液和NaCl的水溶液。其餘實驗組則是添加使用C18逆相層析管柱，以純水和甲醇將濾液分提成六管，分別為極性較高而溶於水層的Flow，與極性較弱以甲醇分段提出的E1、E2、E3、E4、E5。其中以E3效果最佳。

在本研究中成功找到了能夠提升番茄苗對高鹽度環境與廢棄機械油汙環境耐受性的菌株。另外，菌株10和2-2號在脂質水解測試的結果中雖未表現出具脂質水解酶分解能力，仍在機械廢油汙染的土壤澆灌實驗中展現改善番茄苗生長狀態的效果。根據參考文獻，分解複雜油污類型的酵素可能為alpha/beta hydrolase或esterase等此類型協助分解芳香族苯環酯類的酵素，已知許多生物分解者亦常產生這些酵素進行海洋油污的分解。我們也於NCBI查詢了*P. megaterium*等發表基因體的菌株中發現，*P. megaterium*確實具有合成alpha/beta hydrolase和esterase的基因，然而進行此酵素分泌的測試時三株菌表現均不明顯，因此推測增進植株對廢棄機械油汙汙染耐受性可能另有途徑。

在本研究初步測試中，也發現了去除了菌體的濾液可能含有生長代謝物使番茄苗抵抗高鹽度逆境。*P. megaterium*菌株使植株增加對逆境可能是透過菌株生長時的分泌物，目前已使用逆相層析管柱分提出可能有助於植株抗逆境的物質，希望為來能進一步找到*P. megaterium*菌株分泌出的物質，未來得以有應用於田間的潛力。

伍、結論

- 一、*P. megaterium* 10、2-1與2-2菌株本身即對惡劣環境具有較高抗性，均能在含10% NaCl培養基上生長，*P. megaterium* 10與2-1菌株能夠存活於50℃的高溫環境。
- 二、*P. megaterium* 2-1與2-2菌株在高鹽逆境條件下，番茄植株的全株長度和鮮重方面均顯著優於其他組別，顯示此菌株在增強植株耐鹽性方面具有應用價值。
- 三、*P. megaterium* 2-1與2-2菌株在機械廢油汙染環境下能促進番茄植株根系生長，增加對油汙染逆境的耐受性，具有潛在應用價值。
- 四、在去除了菌體的濾液中應含有能增強番茄植株耐鹽性的物質，初步推測為菌株之生長代謝物，未來可以進一步分析具有抗逆境潛力的物質。
- 五、在本校的高一多元選修課程中，另有同學在蘭嶼羅漢松、仙丹花、蔓花生上也發現*P. megaterium*，可見*P. megaterium*可廣泛分布在校園植物上。

陸、參考文獻

1. Hwang, H., et al. (2022, October 17). A plant endophytic bacterium *Priestia megaterium* strain BP-R2 isolated from the halophyte *Bolboschoenus planiculmis* enhances plant growth under salt and drought stresses. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36296323/>

2. Hwang, H., et al. (2021, August 10). A Plant Endophytic Bacterium, *Burkholderia seminalis* Strain 869T2, Promotes Plant Growth in *Arabidopsis*, Pak Choi, Chinese Amaranth, Lettuces, and Other Vegetables. MDPI. <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/8/1703>

3. Seger, G. D. S., Fernandes, G. C., Lisboa, B. B., & Passaglia, L. M. P. (2016, March). Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. ScienceDirect.

4. Bach, E., <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0929139315301189>

5. Biedendieck, R., Knuuti, T., Moore, S. J., & Jahn, D. (2021, July 15). The “beauty in the beast” —the multiple uses of *Priestia megaterium* in biotechnology. PMC. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8390425/>