

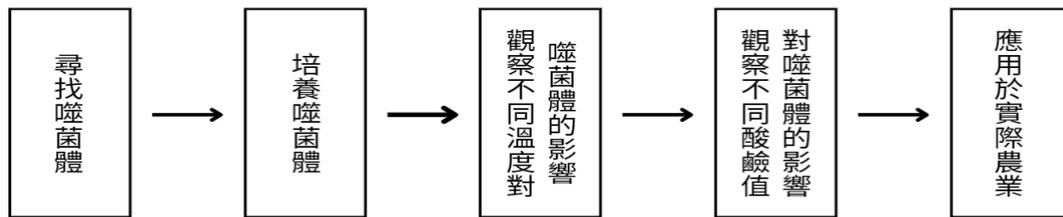
# 2025 年【科學探究競賽-這樣教我就懂】

## 普高組 成果報告表單

<b>題目名稱：</b> 青枯的終結者：來自土壤的微型英雄
<b>一、摘要</b> <p>青枯病菌（<i>Ralstonia solanacearum</i>）為一種廣泛影響經濟作物的土壤性病原菌，具有高度的休眠性與抗藥性，使得傳統化學農藥防治成效有限，並可能對環境造成長期危害。為尋求更環境友善且具專一性的替代方案，本研究著眼於噬菌體作為青枯病菌的生物防治資源。我們自自然環境樣本中分離潛在噬菌體，並透過雙層瓊脂法（<b>plaque assay</b>）與斑點試驗（<b>spot assay</b>）進行初步篩選與感染活性測試。實驗結果顯示多株噬菌體對青枯病菌具明顯裂解作用，顯示其應用於植物病害防治的潛力。未來可進一步評估其穩定性、宿主範圍與實際農田應用成效，以作為發展永續農業之生物防治策略的重要基礎。</p>
<b>二、探究題目與動機</b> <p>番茄作為經常出現在餐桌上的蔬菜之一，從隨處可得的番茄醬到漢堡中的番茄切片，我們的生活幾乎離不開番茄。根據聯合國糧食及農業組織統計，2024 年全球番茄的總產量高達 1.92 億噸，是產量最高的蔬菜作物（FAO, 2024）。</p> <p>然而，在番茄的生產過程中，有一種由細菌引起的病害——青枯病。在熱帶和亞熱帶地區，青枯病導致番茄作物高達 90% 的減產（Elphinstone, 2005）。</p> <p>現今市面上治療青枯病的方法仍有很多的限制，因此一旦番茄感染青枯病菌，大多只能改種植其他作物。目前以預防感染青枯病菌為主，例如使用植物性有機質肥料。事實上，曾感染青枯病菌的農地，即使休耕一段時間再種植番茄，植株仍有可能會再度感染青枯病菌。</p> <p>對於農業感染的治療。除了現今普遍使用的農藥治療外，更有學者提出利用生物防治的方法去改變農業環境。考慮到番茄青枯病菌的休眠性及抗藥性，使用農藥並不是最佳的療法及環保有效的防治。且噬菌體有絕對寄生的特性，可以較準確的解決感染問題。因此我們認為可以由此開始研究噬菌體治療，希望可以藉由研究結果找出可以有效對抗青枯病菌的噬菌體，應用於實際農業並減少發病量。</p>
<b>三、探究目的與假設</b> <p>目的：研究番茄青枯病菌噬菌體於不同溫度及酸鹼值環境中的噬菌力及活性。</p> <p>假設一、番茄青枯病菌噬菌體在 28°C 及 37°C 及 60°C 不同溫度環境下皆可存活。</p> <p>假設二、番茄青枯病菌噬菌體在不同酸鹼值環境下只有中性環境適合噬菌體作用。</p>
<b>四、探究方法與驗證步驟</b> <p>一、研究器材及耗材</p> <p>器材：培養皿、離心機、微量定量吸管（<b>micropipette</b>）、試管、酒精燈、細菌生長箱</p>

耗材：土壤、水、瓊脂培養基（CPG agar）、青枯病菌宿主、噬菌體緩衝溶液（phage buffer）、雙倍上層瓊脂（2X CPG top agar）、噬菌體（phage）

## 二、研究架構



## 三、研究方法

（一）利用文獻研究法在研究中參閱相關文獻的實驗設計、方法或技術，幫助我們確認實驗方法的可靠性與有效性，從文獻中參考過去噬菌體治療植物病菌的案例，以及噬菌體在植物病害控制中的應用，並參考實驗數據，再加以轉換運用到我們的實驗中，延伸出不同於文獻的實驗。

### （二）實驗研究法

#### 1、土壤採樣 (Soil sampling)

1. 挖取採樣點深度約在土表下 15-30 cm 處之土壤，置於不同夾鏈袋中
2. 於夾鏈袋上清楚標示採樣地點 GPS 座標與時間，並記錄樣本的物理性質
3. 以 2 mm 孔徑的篩網過篩樣本土，以除去較大的土塊和植物殘骸。

#### 2、噬菌體之直接分離 (Direct isolation)

1. 將已過篩的土添加進入 50 mL 離心管的 15 mL 刻度處，添加液態培養基至 35 mL 刻度處。
2. 以 210 rpm 在 28°C 生長箱中震盪培養 2 hr 後再以 2000xg 離心。
3. 上清液以濾紙初步將細沙去除，其濾液再以 0.45  $\mu\text{m}$  濾膜進行過濾，取得噬菌體濾液 (phage filtrate)。
4. 取一部分噬菌體濾液進行層瓊脂試驗，檢測直接分離法是否有噬菌體的存在。另一部分的噬菌體濾液將添加 500  $\mu\text{L}$  的宿主，進行增殖分離。

#### 3、增殖分離法 (enriched isolation)：

1. 將已經添加宿主之噬菌體濾液於 28°C 生長箱以 210 rpm 震盪培養 2-7 天
2. 在培養的第 2 天與第 7 天取部分濾液以 13000xg 離心，其上清液進行層瓊脂試驗，確認是否有噬菌體的存在。

#### 4、序列稀釋 (serial dilution)

1. 在無菌環境下取數個 1.5 mL 微量離心管，並做標示。
2. 於微量離心管中以微量定量吸管添加 180  $\mu\text{L}$  噬菌體緩衝溶液。
3. 於第一管微量離心管中以微量定量吸管添加 20  $\mu\text{L}$  之噬菌體懸浮原液後，上下抽取液體混合均勻後，取其 20  $\mu\text{L}$  之稀釋液至下一管微量離心管中。
4. 重複操作上述動作直到所有的微量離心管皆操作完成，完成置備各稀釋倍率之噬菌體懸浮液。

#### 5、雙層瓊脂試驗 (double layer agar assay) 與液滴試驗 (spot assay)

1. 於無菌的環境中，在試管中加入 200  $\mu\text{L}$  宿主、100  $\mu\text{L}$  噬菌體懸浮液 (phage lysate)，以無菌水加到終體積為 2500  $\mu\text{L}$ 。
2. 加入等體積的 2X top agar 後，以手前後搓揉試管將液體混合均勻。
3. 將混合液倒到培養皿中並且以旋轉的方式直到混合液平鋪於培養皿中，待其完全凝固後於 28°C 生長箱中倒置培養 24 hr。
4. 調整層瓊脂試驗，不添加 100  $\mu\text{L}$  噬菌體懸浮液以置備細菌毯 (bacterial lawn)，待其凝固後，滴 10  $\mu\text{L}$  之不同十倍序列稀釋倍率之噬菌體稀釋液，待液體蒸發後，於 28°C 生長箱中倒置培養 24 hr。

#### 6、收集溶解產物 (Collecting plate lysates)

1. 以層瓊脂試驗製備網狀盤 (webbed plate)，於無菌環境下添加 5 mL 噬菌體緩衝液，搖晃使其均勻分布於皿中後靜置 2.5 hr。
2. 以微量移液管收集液體，並以 0.45  $\mu\text{m}$  濾膜過濾後以液滴試驗確認噬菌體懸浮液之濃度。若噬菌體懸浮液之濃度高於  $1 \times 10^{-9}$ ，即為高濃度噬菌體懸浮液 (high titer lysate, HTL)。

#### 7、噬菌體在不同溫度下的變化

1. 分別測定在 28°C (室溫)、37°C (溫室土溫)、60°C 下的噬菌體經過 0 小時、1 小時、2 小時的存活量。
2. 使用 96 孔盤進行十倍序列稀釋後進行液滴試驗檢測噬菌體濃度的變化。

#### 8、噬菌體在不同 pH 值下的變化

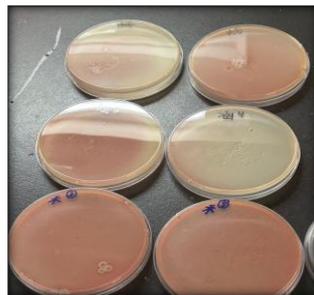
1. 分別測定在 pH5、pH7、pH9 下的噬菌體經過 0 小時、1 小時、2 小時的存活量
2. 使用 96 孔盤進行十倍序列稀釋後進行液滴試驗檢測噬菌體濃度的變化。

### 四、實驗結果

#### 一、尋找噬菌體

一開始我們使用的是台大農場曾經種過番茄的土壤，試圖藉由離心此土找到青枯病菌噬菌體；然而卻未找到。為找到青枯病菌噬菌體，我們從雲林合作農場尋找來了曾經發病過青枯病的土壤來做離心，我們利用曾經發病青枯病的土壤做分離，尋找噬菌體，然而利用直接分離法沒有成功分離到噬菌體。添加宿主進入土壤後進行增值分離，成功於培養基中發現不同型態的溶菌斑。為了後續的分析的穩定性，於培養基中各挑選較大的溶菌斑 (plaque)，進行噬菌體的純化。純化步驟進行三次。本研究成功分離出六種噬菌體，命名為 H、I、He、Yu、Overture (O)、糯米糰子 (米)。在培養及放大的過程中，H 噬菌體不幸因濃度過低而死亡。

圖一、雲林合作農場土壤資訊 圖二、一開始未尋獲噬菌體的結果



圖三、合作農場土地的地圖座標及 GPS



一號土	23.693588, 120.429202
二號土	23.6624879, 120.3925251
三號土	23.6633487, 120.3884780
四號土	23.6525361, 120.43816528
五號土	23.6913559, 120.4283762
六號土	23.6974891, 120.4240625

## 二、溫度與噬菌體的影響

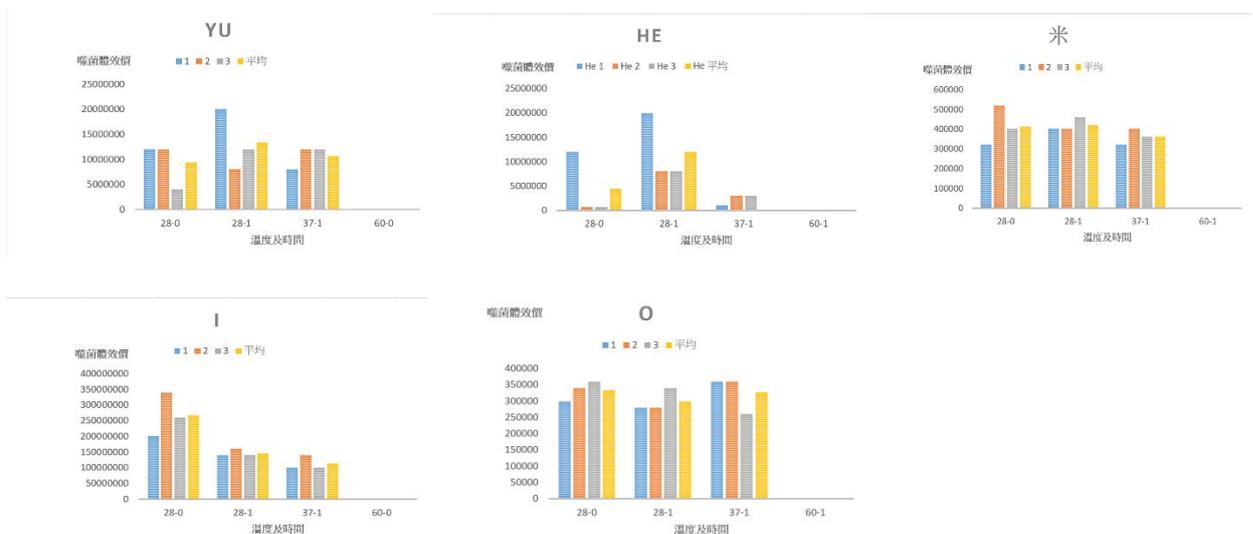
我們將培養箱的溫度設定在 28°C、37°C、60°C，以 28°C 代表偏低於常溫種植環境；37°C 代表偏高於常溫種植環境；60°C 代表超高溫。利用已培養好的五隻噬菌體，將包含青枯病菌宿主及噬菌體的培養皿放入培養箱培養一小時，並做三重複降低實驗失誤機率。

圖四為噬菌體效價在不同溫度的實驗結果紀錄表。我們以噬菌體效價表示噬菌體在不同環境中的存活率及噬菌力。以下為噬菌體效價之算法：

$$\text{噬菌體效價 (pfu/mL)} = (\text{斑點數} \times \text{稀釋倍數}) / \text{接種量}$$

可知，五隻噬菌體分別為 He、I、Yu、O、米，在 60°C 時噬菌體的噬菌效價幾乎為 0，培養皿上並未出現溶菌斑。而隨著溫度的升高 He、I、Yu、米的噬菌體效價都降低，即在 28°C 時，噬菌體的效價都高於 37°C。而 O 則是在 37°C 時的噬菌體效價較高於 28°C。

圖四、各噬菌體的溫度與噬菌體效價的長條圖

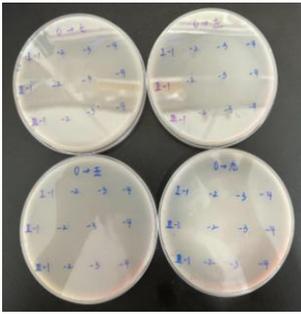


## 三、酸鹼值對噬菌體的影響

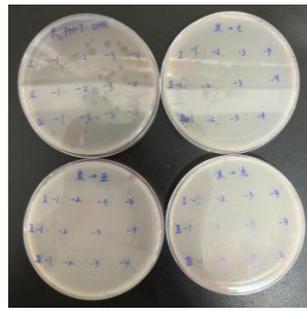
我們將培養皿中的緩衝溶液調整為 pH=5 (偏酸性)、pH=7 (中性)、pH=9 (偏鹼性)，並觀察中性環境下放置的第 0 個小時及在三中酸鹼值環境下放置一個小時的噬菌效果，同時做三重複的步驟確保實驗失誤率降低。最後得出結論，O、米的實驗結果如圖五、圖六所示，未有溶菌斑即噬菌體存在的痕跡。I、He、Yu 的實驗結果如圖七、圖八、圖九所示，培養皿結果所顯示 I、He、Yu 三種噬菌體的溶菌斑數量皆無法準確計數，存活率接近 100%。

圖五、O 在不同 pH 值下的培養結果

圖六、米在不同 pH 值下的培養結果



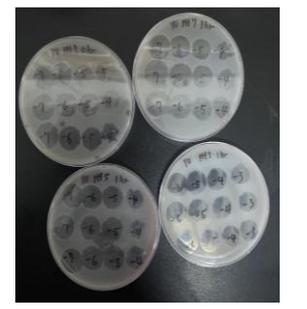
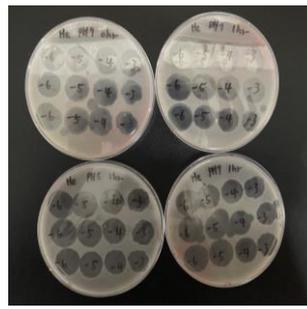
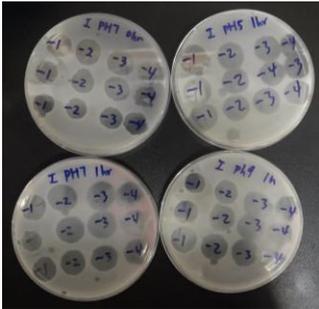
圖七、I 在不同 pH 值下的培養結果



圖八、He 在不同 pH 值下的培養結果



圖九、YU 在不同 pH 值下的培養結果



## 五、結論與生活應用

- 一、本研究採用由土壤萃取到的五種不同噬菌體，在三種不同溫度下進行培養，我們發現在過度高溫的情況下（60℃），噬菌體的存活率幾乎為 0，噬菌反應也為 0。研究結果顯示，我們所設定的常溫（28℃）最適合噬菌體存活，噬菌反應也最高；而在偏高溫環境（37℃）噬菌體相較之下存活率較低，但依舊可以維持一定的活性及效能。這些研究結果表明溫度是一大影響噬菌體活性及穩定度的因素之一，隨著溫度的升高，部分噬菌體可能會有一些結構上的改變，例如：外殼蛋白或 DNA 的熱變性，進而導致活性降低。然而，不同噬菌體也有不同適合的環境，例如 O 的實驗結果中推測即是較適合偏高溫的環境。
- 二、五種不同噬菌體在 pH=5（偏酸性）、pH=7（中性）、pH=9（偏鹼性）的環境下根據研究結果顯示在所有 pH 條件下，三種噬菌體的溶菌斑數量皆無法準確計數，且存活率接近 100%。由於番茄最適合生長的环境酸鹼值為 pH=5~8，因此，透過實驗結果可推測我們所篩選到的噬菌體 I、He、Yu 於適合番茄生長的环境的生存狀態十分理想，推論其皆具有未來應用的潛力。
- 三、在「不同酸鹼值環境」的觀察實驗中，噬菌體 O 及米的實驗結果有極大誤差，目前我們推測出了兩種結論，一種是此二種噬菌體有特定且唯一適合存活的酸鹼值環境，或是實驗過程中出現了未知干擾因素導致實驗結果偏差。由於三重複的實驗結果皆有較明顯的誤差，噬菌體存活率及噬菌能力幾乎為 0，未來會針對此問題與指導老師討論並做出進一步的研究及改進。
- 四、由我們的研究推論，噬菌體在農業應用中會受到溫度的顯著影響。在炎熱的夏季或高溫地區，噬菌體的活性可能受到抑制，因此在使用時需要考慮適當的保存與施用條件，例如：儲存於常溫處或較低溫處、噴灑於清晨或傍晚的方式來避免高溫對噬菌體活性的影響。同時，針對具有不同溫度耐受性的噬菌體進行篩選與改良，也可能進一步提高其在實際應用中的穩定性與效果。

五、待完成更為詳細的觀察實驗後，我們實驗小組會將其應用於實際農業環境中，進一步進行溫室或田間試驗，觀察並評估噬菌體是否會受到雨水、日光、土壤等其餘因素影響，並測定使用不同施用方式，例如：大面積噴灑或土壤灌注是否可以盡可能的提高噬菌體噬菌功效，達成有效且環保的生物防治法。

#### 參考資料

王冠中（2009）· 植物青枯病菌及其噬菌體交互關係之探究· [未發表之碩士論文]· 國立臺灣大學。

林駿奇（2009）· 作物青枯病之生態與防治· 花蓮區農業專訊，70，18-21。

張維仁（2015）· 青枯菌處理對玉女蕃茄生長特徵之影響 [未發表之碩士論文]· 大同大學。

蔡佳欣、黃淑苓、李佳蓉、林靜宜、呂昀陞（2020）· 青枯病菌引起之番茄青枯病· 台灣農業研究，69(4)，274-285。

農業知識入口網（2008年9月18日）。青枯病。

<https://kmweb.moa.gov.tw/subject/subject.php?id=16170>

Álvarez, B., López, M. M., & Biosca, E. G. (2019). Biocontrol of the major plant pathogen *Ralstonia solanacearum* in irrigation water and host plants by novel waterborne lytic bacteriophages. *Frontiers in microbiology*, 10, 2813.

Balogh, B. (2006). Characterization and use of bacteriophages associated with citrus bacterial pathogens for disease control. Dissertation, University of Florida

Balogh, B., Jones, J. B., Iriarte, F. B., & Momol, M. T. (2010). Phage therapy for plant disease control. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11, 48 – 57.

Elnaggar, S., Mohamed, A., Bakeer, A., & Osman, T. (2018). Current status of bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) disease in major tomato (*Solanum lycopersicum* L.) growing areas in Egypt. *Archives of Agriculture and Environmental Science*, 3, 399-406.

FAO. (2024). Agricultural production statistics 2010 – 2023. *FAOSTAT Analytical Briefs*, No. 96. <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cd3755en>

Mallmann, W. L., Hemstreet, C. (1924). Isolation of an inhibitory substance from plants. *Journal of Agricultural Research*, 28, 599-602.