

## 口腔微生物学实验教学的改革和创新

聂敏\* 李汉萍 易安华 魏萍 闵智鹏 陈东

(湖北省口腔基础医学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地 口腔生物医学教育部重点实验室  
武汉大学 湖北 武汉 430079)

**摘要:**根据口腔微生物学的概念更新,对传统实验教学体制进行改革,增强实验内容的设计性和创新性,优化基础实验、专业实验、综合实验、创新实验同时交替的实践教学体系,有效地提高了实践教学水平。

**关键词:**口腔医学,微生物,实验教学,改革

## Reform and innovation of Oral Microbiology experiment teaching system

NIE Min\* LI Han-Ping YI An-Hua WEI Ping MIN Zhi-Peng CHEN Dong

(The State Key Laboratory Breeding Base of Basic Science of Stomatology, Hubei Province & Key Laboratory of Oral Biomedicine, Ministry of Education, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430079, China)

**Abstract:** According to the updating concept of Oral Microbiology, it was reformed on traditional experimental teaching system. We have enhanced experimental contents and innovative design to optimize the teaching system by alternating at the same time of basic experiment, specialized experiment, comprehensive experiment, innovative experiment, and innovate while alternating teaching system, effectively improve the practice of teaching. By teaching reform, we have effectively improved the level of practice teaching.

**Keywords:** Oral medicine, Microbiology, Experimental teaching, Reform

口腔医学是一门实践性、操作性很强的学科,有其内在的规律和特殊性。口腔微生物学属于微生物学和口腔医学的交叉学科,涉及微生物学、龋病学、牙周病学;既是微生物学的一个分支,又具有突出的专业特点,与口腔临床紧密相连。口腔微生物学内容包括口腔生态系及其影响因素、牙菌斑和生物膜、口腔正常菌丛、口腔微生物学研究的主要方法<sup>[1]</sup>。实验教学是高等教育人才培养过程的重要

组成部分,是培养学生实践能力、创新能力,实施素质教育的重要环节。实验课的增设是理论课的延伸,与理论教学相辅相成,是我校教学改革的一部分。实验课的教学目的是培养学生的科研兴趣和能力的,加深学生对龋病和牙周病病因学的认识。因此,口腔微生物学实验课程有助于提高口腔医学教育质量,培养适应新世纪要求的高素质创新型的医学人才<sup>[2]</sup>。

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81101221)

\*通讯作者: Tel: 86-27-87686102; 信箱: nm.minmin@tom.com

收稿日期: 2013-05-02; 接受日期: 2013-09-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

## 1 口腔微生物学实验教学的必要性

### 1.1 口腔微生物学理论的更新

**1.1.1 龋病病因的更新:**龋病是损害我国人民群众口腔健康的常见病、多发病。卫生部第三次全国口腔健康流行病的调查结果显示,目前我国5岁儿童的乳牙患龋率为66.5%,35-44岁中年人患龋率88.1%,65-74岁老年人高达98.4%<sup>[3]</sup>。龋病是以细菌为主的多种因素导致的牙体硬组织发生慢性、进行性破坏的常见病。20世纪50年代起,龋病的病因被认为是细菌感染性疾病。但是近年来,龋病被认为是内源性感染性疾病,是菌斑群体失调引起的<sup>[4-6]</sup>。尤其第四版的《口腔生物学》指出:“直到目前为止,菌斑中还没有任何一种微生物被证明完全符合郭霍法则”。

所以,目前认为龋病病因是生态菌斑失调。生态菌斑致龋学说不仅仅强调了致龋相关微生物的作用,更指出了龋病预防中同样需重视那些可能引起生态改变的其他因素(如食物中摄取的糖与影响到糖滞留的宿主因素)。同时,生态菌斑致龋学说也不再刻意突出某些致龋相关菌的地位,而是强调了功能微生物群的作用,能产酸与耐酸的微生物都可能是致龋菌,从而在龋病的防治上可能更需要注重生态的维持<sup>[1]</sup>。

**1.1.2 牙周病病因的更新:**卫生部第三次全国口腔健康流行病的调查结果显示,我国成年人牙周病的患病率高达85%左右,中老年人牙周健康率低于20%<sup>[3]</sup>。牙周病是以革兰氏阴性厌氧菌感染为主的发生在牙齿支持组织的慢性、非特异性、感染性的疾病,对于多数人来说,牙周病的病因主要由于口腔卫生不良,导致牙周致病菌的聚集与繁殖<sup>[4]</sup>。目前已公认牙周病是多因素疾病,第四版的《口腔生物学》明确提出“牙周生态菌斑致病学说”。绝对厌氧菌的过度增殖引起了牙周病,其他可以干扰宿主-微生物间生态平衡的因素还包括创伤、系统疾病或药物治疗后所致的免疫状态的改变甚至吸烟等不良生活习惯等也都应考虑在内。因此,与龋病相似,牙周病也是由于生态失衡而致的内源性感染

性疾病<sup>[1]</sup>。

**1.1.3 对口腔微生物的新认识:**口腔链球菌(*Oral streptococci*)为一群带有各种各样特征的链球菌群,因此它们的命名经常变动。口腔链球菌属的菌群现在分为四类:变异链球菌组群、唾液链球菌组群、咽峡菌组群(原米勒链球菌)、轻链球菌组群。

*Clostridium* 由原来的“梭状芽孢杆菌属”简称为“梭状菌”,与人类疾病有关的菌种为肉毒梭菌(*C. botulinum*)、艰难梭菌(*C. difficile*)、产气荚膜梭菌(*C. perfringens*)、破伤风梭菌(*C. tetani*)。

聚集杆菌属(*Aggregatibacter*)是近年从嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、放线杆菌属(*Actinobacillus*)中新分列出的一种新菌属。口腔中最主要是伴放线聚集杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Aa)。该菌最先被归于放线杆菌属(*Actinobacillus*),曾被称为伴放线放线杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Aa);后由于其具有嗜血菌属的生长特性,被归于嗜血杆菌属,称为伴放线菌嗜血菌(*Haemophilus actinomycetemcomitans*, Ha)。近年,随着生化鉴定技术与分子基因学研究手段的进步,该菌与 *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* 与 *Haemophilus segnis* 等菌一起从嗜血菌属中划分出来,独立归属于全新的聚集杆菌属。

### 1.2 口腔微生物学实验教程的更新

以前的实验方法只有3个部分:牙菌斑和龈沟液的采集和处理、细菌的分离和培养、鉴定细菌的常规程序<sup>[7]</sup>。最新的第四版的《口腔生物学》将实验部分单列为一章,口腔微生物学实验包括5个部分:(1)菌斑的采集、染色和观察、分类;(2)变异链球菌的分离和鉴定;(3)细菌代谢酸的测定;(4)细菌细胞外葡聚糖的测定;(5)菌斑中pH值的测定。

要求(1)掌握牙菌斑等标本细菌的采集、处理和常用染色,熟悉龈上或龈下菌斑中常见细菌的形态及分类方法;(2)掌握菌斑标本中变异链球菌的分离、培养和表型鉴定的主要程序和方法,熟悉牙菌斑中常见细菌的菌落特点、菌细胞的形态及革兰

染色特点；(3) 掌握细菌酸分析的基本方法，了解色谱技术定性和定量检测分析的基本原理；(4) 掌握用比色法测定葡聚糖含量的方法和原理；(5) 掌握一种菌斑 pH 测定的基本方法。

## 2 口腔微生物学实验教学体系的改革和创新

### 2.1 实验教学体系改革的目的

传统的实验室管理体制依附于教学管理体制，实行校、系和教研室三级管理，随着实验教学的不断改革和人才培养的需要，原来实验教学体制的弊端越来越明显，主要表现为：(1) 重复建设多：表现为教学内容重复和实验室建设重复，造成时间和物质的浪费。(2) 管理不科学：各实验室归相应系部管理，相互之间不能有效进行整合和共享。(3) 实验教学结构不合理：验证性实验比例较大，综合性或创新性实验较少，难以满足国家对培养创新性人才的需要<sup>[8-9]</sup>。

紧跟口腔微生物学科理论和研究热点，创新实验教学体系的目的在于：(1) 实验课是理论课教学的补充，通过实验来检验理论课所学的知识，将抽象概念形象化，加深对理论课的理解。(2) 通过实验课让学生掌握口腔微生物学实验的常用技能，掌握医学微生物学的相关安全知识。(3) 培养学生的专业技能和科研能力，培养综合素质，引导学生的创新能力，发挥其主观能动性。

### 2.2 口腔微生物学实验教学内容的更新

根据前沿知识，更新口腔微生物学实验教学内容，实施特色化的教学模式。实验教学内容包括：牙菌斑的采集和处理、致龋菌的分离和培养、变链菌的鉴定、变链菌基因组的提取。教学方式采用学生两两配对模式。具体要求是：掌握分离和培养致龋菌的主要步骤和方法，掌握鉴定变链菌的方法，掌握变链菌的菌落特点，掌握变链菌基因组提取的方法。

**2.2.1 牙菌斑的采集和处理：**牙菌斑的采集是分离鉴定细菌的首要步骤，考验学生的口腔检查操作技能。采集龈上菌斑多以分离培养致龋菌为目的，采

集牙菌斑，收集并传输样本，先后采用漩涡振荡和超声振荡，使菌斑或细菌团块分散，将分散的菌斑标本做系列稀释，不同样本的稀释程度不同，稀释过程均要求无菌操作。

**2.2.2 致龋菌的分离和培养：**选用 MS 琼脂选择性培养皿表面划线接种，给予口腔微生物厌氧培养环境，培养原代细胞。从初代培养板上挑取典型的菌落，在无菌条件下接种于液体培养基，次代增菌培养。

**2.2.3 对口腔微生物的实验观察：**解剖显微镜下，观察初代培养皿上的菌落，分辨致龋性细菌和非致龋性细菌的区别，记录菌落形态特征，包括形态、大小、厚薄、边缘、透明度、颜色等。取液体培养基中的菌液做革兰氏染色，显微镜下观察。对口腔微生物进行生化鉴定，分别加入甘露醇、山梨醇、棉子糖、蜜二糖、精氨酸，厌氧孵育，观察结果<sup>[10]</sup>。

**2.2.4 优化部分实验，提取变链菌基因组：**从液体培养基中取菌液再次涂布选择性培养皿，给予厌氧环境，纯化培养。在无菌条件下，从次纯代培养的培养皿上挑取菌落，液体培养基增菌。收集菌体，裂解细胞，采用特殊的口腔微生物基因组提取法，提取细菌 DNA。

**2.2.5 分析实验结果：**总结实验数据和结果，分析成功和失败的原因，培养学生的科研积极性。

### 2.3 口腔微生物学实验教学体系的特点

本课程积极推进研究性学习和合作式学习，开发了自主性和创新性的实验教学内容，所设置的四个实验层层递进，环环相扣，每一个实验都是后一个实验的基础，培养学生对科研流程的认识和学习，也加大了学习难度，对学生是一个巨大的考验。通过开设实验课，让学生感受挫折、不足、乃至成功的经历，从而激发学习和科研的欲望，提高基础技能和专业技能。

改革后的口腔微生物学实验教学体系的特点是：四个实验教学模块，即基础实验、专业实验、综合实验、创新实验同时交替<sup>[8]</sup>。

基础实验：指微生物学实验的基本操作技能，

如：医学检验安全防护、培养基的制备、器皿和培养基的灭菌、无菌操作技术、显微镜的操作、细菌染色、细菌的分离等。本课程需要学生已经掌握上述实验技能。基础实验是开设本课程的基本要求，反映了学生最根本、最基础的微生物学实验基本操作能力。

**专业实验：**本课程突出专业技能训练，如：口腔检查、牙菌斑的临床取样、口腔细菌基因组 DNA 的提取。符合口腔医学特色，体现了学科专业性，培养学生适应口腔医学发展需要的专业基本技能，重点解决如何应用专业知识的能力培养。专业实验是开设本课程的特色，反映了学生的专业技能。

**综合实验：**本课程突出综合能力训练，注重研究性设计。通过整合基础医学和口腔临床医学，整合微生物学和龋病学、牙周病学、分子生物学，拓展学生的视野，引发学生思考。例如：如果学生没有分离出变链菌，可能是多种原因导致的，学生需要根据每一步的实验步骤和结果分析，是取样的时候发生的问题，取到的是口腔牙间残渣，而不是以牙菌斑为主的样本？还是分离标本的时候振荡不均，没有形成悬浊液？还是涂布平皿的时候，基本操作技术不过关，涂皿过密，导致变链菌不能生长成独立的、清晰的菌落？等等。综合实验是开设本课程的优势，是学科内不同专业的综合实验。

**创新实验：**本课程重视科学思维、研究能力和创新意识的培养。教师提出实验目标，学生自主选择，基于上述的三个环节进行专题研究和综合研究。比如，致龋菌的选择性培养失败了，学生能否创新地想到培养非致龋菌，比较致龋菌与非致龋菌

的差别。再如，分离到致龋菌的同学，为什么大家提取基因组的结果不同？创新实验是开设本课程最有趣的内容，最能够开发思维，最能够发挥学生的创新能力和科研能力。

本课程对授课教师的要求较高，需要有过硬的专业知识和科研技能。教师需要进行详尽的实验指导和示范，分析问题，与学生一起总结教训、思考问题。本课程对教学环境的要求较高，需要有较高层次的科研平台，我院的实验课在口腔基础医学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地完成教学，借助重点实验室平台更有助于教学体系的完善。

### 3 实验教学改革成效

2012 年 12 月的年度教学为高等教育第四年的 2009 级学生，共 67 名。

实验一和实验二，采集牙菌斑，分离致龋菌，既是基础技能的考验，也是口腔临床专业技能的培训。一半的学生从 MSB 选择性平皿上培养出变异链球菌(表 1)，体现了较好的综合能力。

实验三，培养致龋微生物，在无菌操作下，将变异链球菌从固体培养基转移到液体培养基中增菌，一式两份。这一部分反映了学生微生物学实验的基本技能(表 2)。前一评分“C”的 30 名学生补充菌源后，67 名学生中 66 名成功转菌。

生化鉴定变链菌，在无菌操作下，将变异链球菌菌液加入生化糖管中，厌氧培养后观察鉴定结果，这一部分反映了学生的综合能力和创新能力(表 3)。

表 1 学生实验一和实验二结果评价

Table 1 Evaluation of the first and second experiment of students

评分 Score	标准 Criteria	结果(人数, 百分比) Results (number, percentage)	能力评价 Evaluation
A	成功培养出致龋菌	30 (44.8%)	基础+专业+综合+创新能力较好
B	培养出其他细菌	7 (10.4%)	专业能力不足
C	未培养出任何细菌	30 (44.8%)	基础+专业能力不足

表 2 学生基本实验技能的评价			
Table 2 Evaluation of the basic experimental skills of students			
评分 Score	标准 Criteria	结果(人数, 百分比) Results (number, percentage)	能力评价 Evaluation
A	两份都培养成功	66 (98.5%)	基础能力较好
B	一份培养成功	1 (1.5%)	基础能力不足
C	培养失败	0	—

表 3 学生实验三结果评价			
Table 3 Evaluation of the third experiment of students			
评分 Score	标准 Criteria	结果(人数, 百分比) Results (number, percentage)	能力评价 Evaluation
A	全部成功	58 (86.6%)	基础+专业+综合+创新能力较好
B	部分成功	0	专业能力不足
C	全部失败	6 (9.0%)	基础+专业能力不足

实验四,变链菌基因组的提取,这一部分结合口腔生物学的第三章分子生物学的内容,有创新,有拔高,是对学生整体素质的优化培养。我们选择性地对从实验一到实验四都能够成功的 30 名学生,增加了这一部分的实验,结果 100%提取出了变链菌的基因组。反应这一部分学生有较好的综合能力。

从实验一到实验四都能够成功的学生有 30 名,占 44.8%,反映出 2/5 的学生具有较好的综合能力和创新能力,10.4%的学生表现出专业能力不足,44.8%学生需要提高基础和专业能力。综合能力较强、专业能力不足、基础和专业能力的比例接近于 2:1:2。

有学生非常成功地培养出两种不同表现型的致龋菌株,对自己的口腔微生物有了非常深入的评价,体会到龋病和致龋菌的关系!有的学生说:“这些在理论课上很难学到的,而这也也许就是实验课的一个目的吧”。有的学生非常惊险地在平皿上找到了一个菌落,小心翼翼地做到实验三,才判断出是不是致龋菌。总结各类原因,有的说:“在无菌操作过程中,操作的敏捷性和划线的手法比较

重要,同时也要注意无菌操作的原则,这样实验才可以成功”。有的学生没有培养出致龋菌,提交报告:“对无菌操作、规范操作的要求很高,这一步一步出现问题,最终的结果可能就会失败,而且无法挽回。”

4 结语

实验教学在培养复合型和创新型人才中具有不可替代的重要作用<sup>[1]</sup>。在原有的口腔微生物学实验教学基础上,我们拓展了口腔微生物学实验教学内容,从单一实验技能的训练逐渐拓展为侧重训练学生将多门理论课知识进行综合利用的能力,从理论课程内容的连续性上升到实验技能的连贯性,如改革后的微生物实验内容将牙菌斑的采集处理、致龋菌的分离和培养、变链菌的鉴定、变链菌基因组的提取等基础实验技能巧妙融合在一起,涉及到的理论课程有“微生物学”、“口腔组织病理学”、“口腔内科学”、“分子生物学”等。我们将不断完善口腔微生物学实验教学体系。

参 考 文 献

[1] 边专主编. 口腔生物学[M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 1-243.

- [2] 张燕, 杜磊, 王月丹, 等. 基础医学实验教学中心在创新型医学人才培养中的建设与效果评价[J]. 实验技术与管理, 2010, 27(7): 4-6.
- [3] 齐小秋. 第三次全国口腔健康流行病学调查报告[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 1-133.
- [4] Carounanidy U, Sathyanarayanan R. Dental caries: A complete changeover (Part II)-changeover in the diagnosis and prognosis[J]. Journal of Conservative Dentistry, 2009, 12(3): 87-100.
- [5] Wright JT. Defining the contribution of genetics in the etiology of dental caries[J]. Journal of Dental Research, 2010, 89(11): 1173-1174.
- [6] Timonen P, Niskanen M, Suominen-Taipale L, et al. Metabolic syndrome, periodontal infection, and dental caries[J]. Journal of Dental Research, 2010, 89(10): 1068-1073.
- [7] 聂敏, 边专, 张旗, 等. 口腔微生物学实验教学体系初探[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 8(24): 757-759.
- [8] 丁轲, 李广录, 赵芙蓉, 等. 地方高校实验室管理存在的问题及改革对策[J]. 实验室科学, 2010, 13(5): 135-137.
- [9] 何晓凡, 秦晓群, 杨绿化, 等. 医学机能学国家级实验教学示范中心的建设与发展[J]. 实验技术与管理, 2010, 27(7): 7-10.
- [10] Nie M, Fan MW, Bian Z. Transmission of mutans streptococci in adults within a Chinese population[J]. Caries Research, 2002, 36(3): 161-166.
- [11] 董妍玲, 潘学武, 黄方一. 生物学实验教学示范中心创新建设与实践[J]. 微生物学通报, 2012, 39(6): 843-847.

## 科技信息摘录

### Science: 科学家培育合成酵母染色体

由美、英、法等多国研究人员组成的科研小组 3 月 27 日宣布, 他们成功合成了第一条能正常工作的酵母染色体。这一成果被誉为攀上了合成生物学的新高峰, 也是向合成人造微生物等生命体迈出的一大步。

研究人员在 4 月 7 日《科学》杂志上报告说, 他们利用计算机辅助设计技术, 历时 7 年成功构造了源于酿酒酵母的被称作 synIII 的染色体, 尽管合成的仅仅是酿酒酵母 16 条染色体中最小的一条, 但这是通往构建一个完整的真核细胞生物基因组的关键一步。

最让研究人员自豪的是这条染色体被成功整合进活体酵母细胞之中。研究负责人、美国纽约大学的杰夫·伯克说: “携带这条合成染色体的酵母细胞相当正常, 它们与野生酵母细胞几乎一模一样, 只是它们还拥有一些新的能力, 能够完成野生酵母无法完成的事件。”伯克认为, 这是一项具有里程碑意义的研究成果, “就像第一个人类基因组被测序完成一样”。

染色体 synIII 在酵母中的原始版本拥有近 32 万个碱基对, 伯克等进行了 500 多处修改, 删除了近 4.8 万个被认为对染色体复制和生长没有用处的重复碱基对, 还删除了一些被称为垃圾 DNA (脱氧核糖核酸) 的序列, 比如不能编码任何蛋白质的序列及能够任意移动并可能导致变异的“跳跃基因”片段, 最终构建的染色体拥有约 27 万个碱基对。

研究人员说, 这项成果将有助于更快地培育新的酵母合成菌株, 用于制造稀有药物, 包括治疗疟疾的青蒿素或治疗乙肝的疫苗等。此外, 合成酵母还能用于生产更有效的生物燃料, 如乙醇、丁醇和生物柴油等。伯克说: “我们的研究实现了合成生物学从理论到现实的转变。”

——摘自《中国生物技术信息网》2014/3/31  
<http://www.biotech.org.cn/information/118056>