

## 创新型实验教学项目建设的探索——土壤微生物分离实验

夏曦中 彭方 车婧 李文化 陈向东 谢志雄\*

(武汉大学 生命科学学院 湖北 武汉 430072)

**摘要:** 武汉大学生命科学学院微生物学实验教学中注重创新型实验教学项目的建设, 创新型土壤微生物分离实验项目建设是培养学生创新能力的一次实践。从武汉大学校园和国家级自然保护区神农架采集土壤样品, 分离土壤细菌、放线菌和霉菌。让学生了解土壤微生物数量测定的基本方法, 学习了解平板计数的基本操作技术。在引申实验过程中又有机地结合与贯穿了微生物学的无菌操作技术、显微镜技术、纯培养技术、分离纯化技术等各项技术及最新的分子生物学研究方法和技术。本实验的创新点有三: 首先, 实验从室内延伸到室外; 其次, 从本科生的常规土壤微生物的分离实验衍生到科研实验(新菌种的分离、鉴定); 最后, 使共性教学衍生为个性化培养。

**关键词:** 创新型实验, 土壤微生物分离, 神农架

## Exploration on innovative experimental item construction for isolation of microorganisms in soil

XIA Xi-Zhong PENG Fang CHE Jing LI Wen-Hua CHEN Xiang-Dong XIE Zhi-Xiong\*

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China)

**Abstract:** It is a practice that we foster students' innovation ability and explore innovation experiment in microbiology experimental teaching. Students were assigned to isolation of bacteria, actinomycetes and molds from campus's soil and Shennongjia's soil, which they had collected during summer field practice. The experiment is aimed at helping students to learn the method for determination of microorganism numbers in soil and master the basic techniques about plate count. The subsequent experiments involve techniques, such as aseptic technique, microscopical technique, pure culture technique, separation and purification methods of microorganisms, and some methods of molecular biology. The experiment has three innovation points. Firstly, the resources of soil were various, which could be collected from campus, Shennongjia, etc. Secondly, the isolates of microorganisms in soil could be used to apply National University or Wuhan University Student Innovation Program, e.g., isolating and identifying of a new bacterial species. The last, it combined common education with personalized teaching.

**Keywords:** Innovative experiment, Isolation of microorganisms in soil, Shennongjia

基金项目: 国家基础科学人才培养基金资助项目(No. J1103513); 武汉大学实验教学中心开放实验资助项目

\*通讯作者: Tel: 86-27-68752090; ✉: zxxie@whu.edu.cn

收稿日期: 2014-03-11; 接受日期: 2014-06-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-09-10

创新是不断进步、发展的动力和源泉,也是当今竞争社会的一种重要能力,没有创新也就无法参与竞争,国家如此,个人也一样。而创新型人才是通过教育培养出来的<sup>[1]</sup>,虽然这涉及到教育的方方面面,但是,课堂讲授和实践教学则是培养人才的前沿阵地。

微生物学实验是一门应用性和实践性都很强的课程,其独特的研究方法和研究手段已经渗透到生命科学的各个领域<sup>[2]</sup>。在微生物实验课中引入创新型实验是我院微生物学实验教学在探索创新实验,培养学生创新能力的一次实践。

土壤是微生物生活最适宜的环境,它具有微生物生长所需要的营养物质和微生物进行生长繁殖及生存的各种条件,所以土壤中微生物的数量和种类都很多。1 g 土壤中就存在着多达  $10^6$ – $10^9$  个微生物个体。可以说,土壤微生物资源种类繁多,数量巨大。

土壤微生物分离实验在“普通微生物学实验”中属于一个常规基础性实验,近年来很多高校在实验方法上有相应的调整与应用<sup>[3]</sup>。我校是研究性综合型大学,我们一直在积极探索既能利用自身地域特色又能培养学生创新能力的实验方法和技术。

武汉大学校园植被丰富,土壤资源丰富,校园土壤作为每年的微生物土样分析实验的来源之一。神农架国家级自然保护区是我院的野外实习基地之一,原始森林中有着极其丰富的生物资源,保存了较为完好的原生和次生生物群落,是研究生物物种多样性、典型性以及植被自然演替规律的理想场所,也是发现新菌种的理想场所。已有学者对神农架的粘细菌和芽孢杆菌做过调查和研究<sup>[4-5]</sup>。

## 1 教学目标

### 1.1 培养学生实践动手能力

让学生在野外亲自动手采集土样,带回实验室进行分析,分离土壤微生物发现新的菌种,能满足学生求知的好奇心,又能培养他们的实践动手能力。

### 1.2 培养学生基本实验技能和创新能力

分离土壤细菌、放线菌和霉菌,让学生了解土壤微生物数量测定的基本方法,学习了解平板菌落计数的基本操作技术,是培养学生创新能力的一次实践。

### 1.3 培养学生对知识点的综合理解

在引申实验过程中有机地结合与贯穿了微生物学的无菌操作技术、显微镜技术、纯培养技术、分离纯化技术等各项基本实验技能,以及分子生物学的研究方法和手段,使学生能够了解并综合利用这些实验技术。同时使学生对微生物资源利用与保护、微生物的多样性有更深刻的认识。

## 2 实验设计

土壤微生物分离实验的学时数为 3 学时,每学期的实验人数是 180 人左右,有 6–7 个平行班,每次实验课的学生人数在 30 人左右,每班有 6–7 个组,每组有 4 人。学生在暑假野外实习时采集土样,老师统一收集后放入 4 °C 冰箱保存,开学后进行实验,校园土壤在课前采集。引申实验不在 3 学时内,主要针对有兴趣分离潜在新分类单元菌株的学生,每年参与引申实验的学生为 10 人左右,2–4 人为一组,以科研小项目的形式进行,通常需要 6–8 个月。

### 2.1 土壤样品的采集和土壤悬液的制备

**2.1.1 校园和神农架土壤样品的采集:**选择离地面 5–20 cm 处采集土壤样品,这个部位的土壤通气良好、不受阳光直射,含菌量最高。采土方法:选择适当地点,铲除表土,用无菌勺取土样数十克,盛入事先准备的无菌离心管或防水纸袋中,其上记录采土时间、地点、植被情况等。采用多点采土、混合分离的方法,以获得同一地块上的微生物分布平均情况。从神农架采集的土样放 4 °C 冰箱保存。

有些同学也会利用暑期时间从自己的家乡,例如新疆或西藏等地,采集土样带回实验室进一步分离鉴定。

**2.1.2 土壤悬液制备:**放线菌检测用悬液 I 制备:取土样 10 g,放入盛有 90 mL 无菌水并带有若干

玻璃珠的三角瓶中, 加入 10%酚 5 滴, 以抑制细菌生长。振荡 10–20 min, 制成  $10^{-1}$  菌悬液。

霉菌、细菌检测用悬液 II 制备: 取土样 10 g, 放入盛有 90 mL 无菌水并带有若干玻璃珠的三角瓶中, 振荡 10–20 min, 制成  $10^{-1}$  菌悬液。

## 2.2 培养基

参照《微生物学实验》<sup>[6]</sup>附录 II 培养基配制, 分别配制牛肉膏培养基、土豆培养基和高氏一号培养基, 用于分离土壤细菌、霉菌和放线菌。

## 2.3 方法

放线菌检测: 利用 150 mL 高氏一号培养基, 倒 9 块平板, 待用。10 倍稀释菌悬液 I, 依次得到  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  菌悬液; 用移液管分别吸取 0.1 mL 的  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  菌悬液, 注入高氏一号培养基平板上, 用无菌玻璃涂布棒将菌悬液均匀涂抹在整个培养基上, 每个稀释度涂布 3 块平板。25–30 °C 温箱中倒置培养 7 d。

细菌检测 利用 150 mL 牛肉膏蛋白胨培养基, 倒 9 块平板, 待用。将霉菌、细菌检测用悬液 II 依次 10 倍稀释得到  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  菌悬液; 用移液管分别吸取 0.1 mL 的  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  菌悬液 (神农架土样中微生物含量较低, 神农架样品取稀释度为  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  的菌悬液), 注入牛肉膏蛋白胨培养基平板上, 用无菌玻璃涂布棒将菌悬液均匀涂抹在整个培养基上, 每个稀释度涂布 3 块平板。25–30 °C 温箱中倒置培养 1–2 d。

霉菌检测: 利用 150 mL 豆芽汁葡萄糖培养基 (倒平板前添加 80%乳酸 0.5 mL), 倒 9 块平板, 待用。将霉菌、细菌检测用悬液 II 依次 10 倍稀释得到  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  菌悬液; 用移液管分别吸取 0.1 mL 的  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  菌悬液, 注入 150 mL 豆芽汁葡萄糖培养基平板, 用无菌玻璃涂布棒将菌悬液均匀涂抹在整个培养基上, 每稀释度 3 块平板。25–30 °C 温箱中倒置培养 3–4 d。

## 2.4 结果与分析

先计算相同稀释度的平均菌落数。若其中一个平板有较多菌落连在一起成片时, 则不应采用, 而

应以不成片的菌落平板作为该稀释度的菌落数。若成片菌落的大小不到平板的一半, 而其余的一半菌落分布又很均匀, 则可将此一半的菌落数乘以 2, 以代表全平板的菌落数, 然后再计算该稀释度的平板菌落数。首先选择平均菌落数在 30–300 之间的, 当只有一个稀释度的平均菌落数符合此范围时, 则以该平均菌落数乘其稀释度, 即为此稀释度的菌总数。若有两个稀释度的平均菌落数均在 30–300 之间, 则按两者菌落总数的比值来决定。若其比值小于 2, 应采取两者的平均数; 若大于 2, 则取其中较小的菌落总数。若所有稀释度的平均菌落数均大于 300, 则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数。若所有稀释度的平均菌落数均小于 30, 则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数。若所有稀释度的平均菌落数均不在 30–300 之间, 则以最接近 300 或 30 的平均菌落数乘以稀释倍数。根据平板上菌落数与平板内土壤悬液的稀释倍数算得每克土壤中微生物的数量<sup>[6]</sup>。比较不同生境微生物组成和数量。

## 2.5 引申实验

随着分子生态学等研究的不断深入, 人们发现自然界中只有很小部分的微生物被认知和开发。从各种生态环境, 特别是一些条件特殊的生态环境中有可能分离到新的微生物物种, 以及有重要应用价值的微生物菌株。例如, 极端环境微生物由于长期的进化选择, 常具有独特的生物活性物质代谢途径、新的调控机制及与这些生理生化特征有关的新基因类型<sup>[7–10]</sup>。

神农架位于湖北西部边陲, 位于中国地势第二阶梯的东部边缘, 由大巴山脉东延的余脉组成中高山地貌, 这里生态环境多样, 很多地方人迹罕至, 是分离微生物新分类单元的理想场所。

土壤微生物分离实验可以帮助有兴趣的学生进一步从稀释涂布后培养的平板中挑取单菌落。也有学生从自己家乡采集土样, 尤其是新疆、西藏等特殊生境, 它们在分离微生物新分类单元方面很有价值。得到单菌落后进行平板划线分离、纯培养、

菌株的生物学特性研究(包括形态学、生理生化、化学分类学等特征)、16S rRNA 基因测序、遗传学和系统发育学分析等,得到序列后在 GenBank 中进行序列比对,一致性小于 97%的即为新菌种。分离到新菌种后,就可以就此所做的工作和数据进行整理,发表文章。对本科生来说不仅经历了科学研究的训练,同时也进行了科技论文的写作训练,发表核心期刊或 SCI 等高水平的学术论文对本科生来说也是一种激励<sup>[11-14]</sup>。2008-2012 年我院本科生作为第一作者或参与作者发表的关于新菌种并被 SCI 收录的文章共计 10 篇。

### 3 结语

本实验目的旨在让学生了解土壤样品采集、微生物数量测定和鉴定的基本方法,学习了解平板计数的基本操作技术。利用课程的特点,将原本由老师准备的实验样本改由学生亲自采集,并将采集范围从熟悉的校园扩至野外和学生各自的家乡,不仅增强了实验的乐趣和学生的参与度,更从源头上让学生理解了实验目的。实验结果的未知性和不可预测性则增加了学生参与实验的热情,并将这份热情保持到更多区域的探索研究。这项尝试对于微生物实验教学可操作性极强、费用增加极少或说无,但对学生的学习效果改变却极佳。我校土壤微生物分离实验以这种形式开展已有 8 年。不少学生还通过参与引申实验,使多项微生物学、分子生物学实验操作技能的综合运用能力有很大的提升,初步体验了科学研究的具体流程,有些还取得了不错的研究成果,建立和培养了创新意识和创新能力。

本实验的创新点有三个:

首先,作为野外综合实习的一部分,采样地点从校园(珞珈山)到神农架。神农架国家级自然保护区是本院的野外实习基地,保护区有着极其丰富的生物资源,保存了较为完好的原生和次生生物群落,是研究生物物种多样性、典型性以及植被自然演替规律的理想场所。在野外实习中增加土样采集这一实习内容让学生在野外亲自动手采集土样,并

带回至实验室进行分析,能满足学生求知的好奇心,又能培养他们的实践动手能力。结合动植物等考察内容,有利于学生全面、整体、多角度认识生物多样性及生物之间及生物与环境之间的适应和谐关系。

其次,从本科生的常规土壤微生物的分离实验衍生到科研实验(新菌种的分离、鉴定),发现新菌种后,可以发表核心期刊或 SCI 收录的学术论文。使他们认识到从本科实验衍生到科研实验并不是一件很难的事,只要自己肯动脑筋,善于发现,并利用本院现有的科研平台就可以完成自己想要完成的科研实验项目。实践表明,实验教学和科研相结合,不仅加深了实验课教学内容的深度和广度,而且可以培养学生严谨的治学态度,消除学生对科研的畏惧感和神秘感,大大提高了学生对科研的兴趣和自信,培养了学生的科研能力<sup>[15]</sup>、创新意识和创新能力<sup>[16-18]</sup>。

最后,使共性教学衍生为个性化培养。全部学生共同完成神农架土壤微生物的分离实验,有兴趣的学生可以继续挑取平板上的单菌落进行新菌种的分离纯化实验,甚至获得新种,还有些学生掌握了这种方法后,从自己的家乡新疆和西藏等拥有极端环境的地方采集到土样,作为小课题申请在开放实验中进行菌种分离。这就使一个单纯的土壤微生物分离实验衍生为一个有难度、复杂的科研实验。对于学生的培养从大众化的共性培养逐步转化为个性化的有兴趣、有潜力的培养和挖掘。

### 参 考 文 献

- [1] 陈向东,唐晓峰,朱应,等. 武汉大学微生物学系列课程国家级教学团队的特色与建设思路[J]. 微生物学通报, 2009, 36(12): 1931-1934.
- [2] 许国权. 微生物学实验教学模式探讨[J]. 实验室管理与研究, 2008, 48(2): 3-26.
- [3] 冯建英,萧蓓蕾,刘丽霞,等. “土壤微生物分离培养”实验的调整与应用[J]. 生物学通报, 2012, 47(6): 34-36.
- [4] 石春芝,陶天申,岳莹玉. 神农架自然保护区大九湖芽孢杆菌资源调查[J]. 氨基酸和生物资源, 2001, 23(1): 1-4.
- [5] 郝光飞,张利平. 神农架样品中粘细菌的分离与纯化[J].

- 安徽农业科学, 2008, 36(14): 5839-5841.
- [6] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 241-242.
- [7] 孙莹, 苏进进, 李潮流, 等. 可可西里碱性土壤样品细菌的分离和生物学特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(10): 1473-1482.
- [8] Bale SJ, Goodman K, Rochelle PA, et al. *Desulfovibrio profundu* ssp. nov., a novel barophilic sulfate-reducing bacterium from deep sediment layers in the Japan Sea[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1997, 47(2): 515-521.
- [9] Chandler DP, Brockman FJ, Bailey TJ, et al. Phylogenetic diversity of archaea and bacteria in a deep subsurface paleosol[J]. Microbial Ecology, 1998, 36(1): 37-50.
- [10] Gold T. The deep, hot biosphere[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(13): 6045-6049.
- [11] Tang Y, Wang Y, Ji S, et al. *Pedobacter xinjiangensis* sp. nov., from the desert, xinjiang[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(2): 397-402.
- [12] Zhang KD, Wang Y, Tang YL, et al. *Niastella populi* sp. nov., isolated from soil of Euphrates poplar (*Populus euphratica*) forest, and emended description of the genus *Niastella*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(3): 542-545.
- [13] Liu M, Dai J, Liu YF, et al. *Desertibacter roseus* gen. nov., sp. nov., a gamma radiation-resistant bacterium in the family *Rhodospirillaceae*, isolated from desert sand[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(5): 1109-1113.
- [14] Luo X, Wang Z, Dai J, et al. *Cohnella damensis* sp. nov., a motile xylanolytic bacteria isolated from a low altitude area in tibet[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(2): 410-414.
- [15] 黄玉屏, 邵雪玲, 黄诗笺. 微生物技术实验教学改革探索[J]. 实验室研究与探索, 2011, 30(9): 266-268.
- [16] 王金发, 戚康标. 实行研究性实验教学培养学生的研究能力[J]. 中国大学教学, 2005(4): 8-9.
- [17] 曹中一. “三性”实验的内涵与特征[J]. 实验室研究与探索, 2003, 22(4): 10-12.
- [18] 李德荣, 张志勇, 赖小荣, 等. 发挥植物学课程优势培养学生实践能力[J]. 实验室研究与探索, 2011, 30(9): 283-286.

## 稿件书写规范

### 论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度) 和 N (当量浓度) 等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD (斜体) 表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 Da 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如:  $t$  (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 与数字之间加一空格(%除外), 例如:  $20\text{ cm} \times 0.3\text{ cm}$ , 不能写成  $20 \times 0.3\text{ cm}$ ;  $3\% - 6\%$  不可写成  $3 - 6\%$  等。