

水质微生物学检验实验模块的教学探索与实践

戴亦军 何伟 袁生* 徐旭士 戴传超

(南京师范大学生命科学学院 江苏 南京 210023)

摘要: 我校采用模块化教学形式开展水质微生物学检验实验教学。该模块由菌落总数测定、总大肠菌群测定及生理生化反应测试以及大肠菌群的血清学测试3个单元实验组成。实验内容以国家标准《生活饮用水标准检验方法——微生物指标(GB/T 5750.12-2006)》规定的程序进行编排。在教学过程中,注重模块实验的标准化操作,让学生树立标准化意识;通过连贯的模块化实验将卫生学检验实验转换为带有基础性的细菌分类学实验,在培养学生微生物学检验操作能力的同时,让学生系统地学习大肠杆菌的各种分类学鉴定方法。该模块的考核形式是学生参照专业机构的检验报告出具校园湖水的水质检验报告以及提交研究论文。水质微生物学检验实验模块的教学改革提高了学生的微生物数量研究能力和细菌分类研究能力,有利于学生开展创新型研究。

关键词: 模块化, 微生物学检验, 菌落总数, 总大肠菌群数, 血清学试验

The exploration and application of the experimental module for microbiological examination of water

DAI Yi-Jun HE Wei YUAN Sheng* XU Xu-Shi DAI Chuan-Chao

(College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210023, China)

Abstract: The modular teaching pattern has been applied to the experimental teaching of microbiological examination of water. The modular content is composed of three units, i.e., the plate-count of bacteria in water, the total coliforms testing in water and examination of their physiological and biochemical properties, and the serological test of coliforms. The experimental contents are organized based on the national standard examination methods for drinking water-microbiological parameters (GB/T 5750.12-2006). In the teaching process, we emphasize on the standardized modular experimental procedure and operation to raise the undergraduate students' awareness of standardization. The continuous modular experiments belonged to the hygienically microbiological examination experiments are converted to the basic experiments of bacteria taxonomy,

Foundation item: The Priority Academic Program Development (PAPD) of Jiangsu Higher Education Institutions; The Teaching Reform Project of Jiangsu Higher Education Institutions in 2013 (No. 2013JSJG205); The Key Project of Teaching Reform of Nanjing Normal University in 2012–2013

*Corresponding author: Tel: 86-25-85891067; E-mail: yuansheng@njnu.edu.cn

Received: March 26, 2015; Accepted: May 15, 2015; Published online (www.cnki.net): May 26, 2015

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 2013年江苏省高等教育教改研究立项课题(No. 2013JSJG205); 2012–2013年度南京师范大学教改研究课题重点项目

*通讯作者: Tel: 86-25-85891067; E-mail: yuansheng@njnu.edu.cn

收稿日期: 2015-03-26; 接受日期: 2015-05-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-05-26

and through which two teaching goals can be achieved. The first is to cultivate the undergraduate students' experimental ability of microbiological testing, and the second is the students will master the systematic taxonomic identification methods for *Escherichia coli*. In the module examination, the undergraduate students are required to write a research paper about this module and fill out a report designed with references to a standard test report from a professional testing institution. The reform of the teaching module for microbiological examination of water can improve the students' research skills in microbiology, specifically in microbial quantitation and bacterial identification, which will be helpful for the undergraduate student to carry out innovative research.

Keywords: Modular teaching, Microbiological examination, Plate-count bacteria, Total coliforms, Serological test

实施模块化实验教学有利于激发学生对实验技能的学习兴趣, 提高学生的探究能力和实验技能综合运用能力。微生物学实验课程是高等学校生物学相关专业的重要基础实践课程之一, 在微生物学实验课中采用模块化实验教学对于培养高质量的生物学人才具有重要意义^[1-2]。我校微生物学实验课程被列为生物科学、生物技术和生物工程专业的基础实践必修课, 在本科第二学年的第二学期开设, 同年级修课学生总数约 180 名, 共设 8 个平行班, 每个教学班级由 12 个实验小组组成, 每两名学生为一组。教学队伍由 6 名指导教师、1 名实验准备教师和 8 名二年级微生物学专业硕士研究生组成。课程教学内容设计成“环境微生物多样性调查”、“功能微生物的筛选鉴定、培养条件优化与选育”和“水质微生物学检验”3 个实验模块, 每个模块由 3-5 个单元实验组成。各模块的单元实验以课题研究的形式串联, 学生在开展课题研究的过程中掌握各项实验操作技术并学会运用这些技术解决实际问题。模块化微生物学实验课自 2008 年开设以来, 受到了修课学生的欢迎, 学生普遍反映学习该门课程有利于提高实验动手能力和树立创新思维^[3-5]。

微生物学检验是微生物学的一个分支学科和重要组成部分, 与人类的健康和生命安全关系密切^[6], 因此我校设置了“水质微生物学检验”教学模块。该模块主要围绕校园内采月湖水库的水质如何这一问题开展教学, 由学生采集湖水样品, 测定其中的菌落总数和总大肠菌群数以及对分离的大肠

菌群进行血清学检验。通过该模块的实验训练, 使学生了解相关微生物检验的国家标准, 熟悉菌落总数和总大肠菌群数检验的技术流程和规范方法, 掌握抗原-抗体反应的玻片凝集法。经过这几年不断地探索和实践, 我校已形成较成熟的“水质微生物学检验”实验模块教学体系。本文介绍了我校在该模块教学中的改革和实践, 与同行们进行探讨, 希望能推进微生物学实验课的教学改革和提高教学质量。

1 教学内容的设计与实施

1.1 教学内容的设计

表 1 显示了我校水质微生物学检验模块的主要实验内容、实验基本流程和需要掌握的关键实验技术和方法。该模块由 3 个单元实验组成, 学生分别采用混合平板法(Pour plate method)测定湖水中菌落总数, 采用多管发酵法检测湖水中总大肠菌群数, 采用玻片凝集法对分离得到的大肠杆菌进行血清学试验。这 3 个单元实验中, 实验 2 的“水中大肠菌群测定及生理生化反应试验”持续时间最长, 学生接种水样 24 h 后观察乳糖初发酵管是否产酸产气, 疑似阳性结果还需继续培养至 48 h 后观察结果; 从阳性发酵管中挑取样品划线至伊红美蓝鉴别培养基上, 培养 24 h 后, 挑取深紫黑色、有金属光泽的菌落, 紫黑色、不带或略带金属光泽的菌落以及淡紫红色、中心色较深的菌落进行革兰氏染色和油镜观察, 确认被挑取的菌体为革兰氏阴性, 无芽孢, 呈杆状; 上述阳性菌株再进行复发酵试验, 培

表 1 水质微生物学检验模块的教学内容、实验流程和关键微生物实验技术与方法
Table 1 The teaching contents and objectives of the modular microbiology experiment course

单元实验名称 Experimental unit plan	基本实验流程 Basic experimental process	关键微生物实验技术和方法 Key experimental techniques and methods for microbiology
实验 1: 水中细菌总数的测定 Experiment 1: Determination of plate-count bacteria in water	采集水样→稀释→制作混合平板→培养→计数	水样采集方法; 混合平板制作技术; 符合计数原则平板的选择和细菌总数计数方法
实验 2: 水中大肠菌群测定及生理生化反应试验 Experiment 2: Total coliforms in water and the physiological and biochemical reaction tests	上述梯度稀释液→初发酵→培养和计数→阳性管中样品划线伊红美蓝培养基→挑取阳性菌落进行革兰氏染色和油镜观察→复发酵验证	平板划线分离技术; 革兰氏染色和油镜使用方法; 微生物生理生化反应鉴定法; 最大似然数(MPN)计数法
实验 3: 大肠菌群的血清学检验 Experiment 3: Serological test of coliforms	兔抗大肠杆菌和沙门氏菌血清和实验 2 获得的大肠菌群培养物→分别稀释→载玻片上混合→孵育→观察沙砾状沉淀	玻片凝集反应试验方法

养 24 h 后观察是否产酸产气。整个实验 2 单元需持续 4 d。

大肠杆菌的血清学试验采用大肠杆菌抗血清和沙门氏菌抗血清与伊红美蓝平板上长出的具有大肠菌群菌落特征的两类细菌进行抗原抗体反应。实验设置 6 个组, 分别为大肠杆菌标准菌和大肠杆菌血清、生理盐水和大肠杆菌抗血清、待测菌株 1 和大肠杆菌抗血清、大肠杆菌标准菌和沙门氏菌抗血清、生理盐水和沙门氏菌抗血清、待测菌株 2 和沙门氏菌抗血清。实验设置了多个对照组, 主要是训练学生正确设置实验的阳性、阴性和空白对照。血清学试验不仅有助于学生了解大肠杆菌的血清型分类知识, 还有助于学生学习微生物学理论课的传染与免疫章节内容。

1.2 教学内容的实施

模块化实验具有很强的连续性以及注重学生实验的主体性。与验证性实验教学相比, 模块化实验显著地增加了学生的总实验时间和做实验的次数以及教师的教学工作量^[3]。如上述多管发酵法检测大肠菌群实验要求学生连续 4 d 开展实验, 指导教师也要多次去学生实验室指导。因此模块化实验教学带来了两个新问题, 一是固定教学时间外的实

验室安排和实验时间协调问题, 尤其是平行班较多时, 这一问题更为突出; 二是指导教师的积极性问题, 模块化教学可能占用教师过多的时间, 影响其他工作的进行, 教师将没有积极性。我校非常重视模块化实验教学的具体实施工作, 在保证教学效果的前提下, 充实实验内容, 提高学生的课堂学习效率, 尽量减少教师的额外教学工作量。经过优化, 我们将水质微生物学检验模块的 3 个单元实验分 2 个周次开展, 具体时间安排如表 2。从表 2 可以看出, “水中大肠菌群测定及生理生化反应试验”实验拆分在 2 个周次完成, 这样安排保证了该模块的核心教学任务都是在每周三的固定教学时间完成, 因为在该时间段内, 所有教学活动均有充分的保障。其他时间的实验如划线分离、观察实验结果所需的时间较短, 有利于各班级间实验时间的协调。另外, 学生在前两个教学模块中已学习了平板划线分离技术, 复发酵验证实验是初发酵试验的重复, 因而第二周的周二和周四的实验可由学生自行完成, 不要求指导教师一定要在现场指导。

我校实行本科生实验教学的研究生助教制度, 学院每年安排 8 名硕士研究生协助教师准备实验, 并随堂作为教师的助手指导学生实验, 配合教师做

表 2 水质微生物学检验模块的教学安排
Table 2 The teaching arrangements of the module for microbiological testing of water

时间 Time	星期二 Tuesday	星期三 Wednesday	星期四 Thursday	星期五 Friday
第一周 First week		安排学生课前采集水样；适当稀释后，混合平板法接种培养 48 h；接种乳糖发酵管(5 管法)进行初发酵试验，37 °C 培养 24 h	计每组产酸和产气的乳糖发酵管数，查阅 MPN 计数表，计算大肠菌群数；可疑发酵管继续培养 24 h；保存 1 管呈阳性结果的初发酵管于冰箱中，留待下周试验用	平板菌落计数；可疑发酵管的计数，查阅 MPN 计数表，计算大肠菌群数
第二周 Second week	上周留存的阳性初发酵管中的样品划线于伊红美蓝培养基上，37 °C 培养 24 h	挑取阳性菌落，进行革兰氏染色和油镜观察；16S rRNA 基因的 PCR 克隆；接种乳糖发酵管进行复发酵试验；玻片凝集法进行血清学检验	观察复发酵管是否产酸产气	

好教学工作。研究生的这些工作认定为教育实习，作为必修课程计入研究生成绩。这些研究生中的部分人是未来微生物学实验课程教学的后备力量，通过实验教学实习，使其耳濡目染，有利于微生物学实验教学后备人才的培养。

2 教学过程中把握的原则

2.1 注重模块实验的标准化操作

水质微生物学检验模块选择了菌落总数和总大肠菌群检测两个项目作为主要实验内容，菌落总数检测采用平板计数法，总大肠菌群检测采用多管发酵法。在中华人民共和国国家标准《生活饮用水标准检验方法—微生物指标(GB/T 5750.12-2006)》中对这两个项目检测所需的培养基成分、培养温度和时间，检测步骤和结果报告方法等均有严格的规定^[7]。笔者在教学过程中非常重视标准化操作，一是实验内容和实验步骤依照国标的检验内容来设计和安排，二是要求学生严格按照国家标准的实验步骤和实验条件进行操作。如国标规定用于菌落计数的平板需在 36±1 °C 温度下培养 48 h，乳糖发酵管需在 36±1 °C 温度下培养 24±2 h，学生必须在上述规定的时间到实验室进行计数和阳性发酵管的观察和记录。国标对平板计数的稀释度和平均菌落数的选择以及菌落总数报告方法有明确要求，学生也必须按照此规范进行计数和出具结果。在经济发

展和日常生活中，标准化具有重要作用，但学生对标准化的了解程度普遍偏低、对标准化作用的认识不深^[8]。通过本模块的严格训练，培养学生树立标准化意识，通过规范化操作培养学生的科研严谨性。

2.2 将细菌鉴定方法的学习融合于基本实验技能的训练，重视学生基础知识和能力的培养

微生物分类学是微生物学科中一门重要的基础性学科，然而其在生物学中的地位和教学队伍越来越弱化，微生物学实验中微生物分类学方面的实验内容则更少^[9]。笔者所在的微生物学学科非常重视本科人才的“厚基础”培养，在微生物学实验中加强细菌分类方面的实验训练。在第 2 模块“功能微生物的筛选鉴定、培养条件优化与选育”中安排学生采用 16S rRNA 基因序列分析法鉴定产淀粉酶细菌。在本模块中学生进一步学习生理生化反应法鉴定大肠菌群，采用乳糖发酵培养基的颜色变化和杜氏小管中是否有气泡来辨别大肠菌群，利用伊红美蓝培养基上显示出不同光泽和颜色来识别大肠菌群的不同种细菌。这两个实验非常直观以及容易判断阳性结果，pH 指示剂显示的不同颜色给学生留下极强的视觉体验，使学生对微生物生理生化反应试验印象深刻，从而加深学生对微生物生理和代谢特点的认识。在第二模块的产淀粉酶菌株的鉴定中，学生筛选到的产淀粉酶菌株大多数是革兰氏阳

性菌株, 由于这些革兰氏阳性菌株的细胞壁厚, 采用菌落 PCR 法克隆 16S rRNA 基因的实验容易失败。在本模块中安排那些失败的实验组再进行一次大肠杆菌 16S rRNA 基因的 PCR 克隆和测序, 在 GenBank 数据库中 BLASTn 分析 DNA 序列和学习系统发育树的构建, 再结合上述生理生化反应鉴定、革兰氏染色、形态观察以及血清学试验, 学生能够较系统地学习细菌的基本鉴定方法。通过连贯的模块化实验将纯粹的卫生学检验实验转换为带有基础性的细菌分类学实验, 在培养学生微生物学检验操作能力的同时, 让学生系统地学习了大肠杆菌的各种分类学鉴定方法。最近武汉大学开展了创新型实验教学项目的建设探索, 将本科生的常规土壤微生物的分离实验衍生到科研实验的新菌种的分离和鉴定, 既让学生掌握了微生物的基本鉴定方法, 又提升了学生的科研能力和创新能力^[10]。

3 考核方式

我校模块化微生物学实验课的考核不要求学生在每个单元实验结束后提交实验报告, 而是要求每个模块实验结束后, 按照研究论文的格式提交一篇论文^[3]。在本模块的考核中, 笔者借鉴了江苏省产品质量监督检验研究院的菌落总数和大肠菌群检验原始记录表样式, 设计了包含上述 3 个单元实验的水质微生物学检验模块的实验记录表。要求学生在实验过程中填写该记录表以及在该表后附上实验结果图片并对图片进行标注和说明。图片包括用于菌落计数的平板, 初发酵试验结果, 伊红美蓝平板上生长的菌落, 革兰氏染色, 复发酵验证结果, 玻片凝集实验结果等 6 组图片, 每个图片要求学生进行标注和文字说明。本模块的检验报告与“环境微生物多样性调查”和“功能微生物的筛选鉴定、培养条件优化与选育”模块的两篇研究论文一起进行综合评定, 占总评成绩的 50%。该成绩与现场实验操作考核的评定成绩(占另外 50%)共同组成学生的课程总评成绩^[3]。上述考核措施一方面能增加微生物学实验的实用性, 另一方面让学生学习整理和整

合图片, 对图片进行规范标注, 从而提升学生的科研素养。

4 教学效果

水质微生物学检验模块以校园湖水中总菌落和总大肠菌群的数量研究以及大肠菌群的鉴定研究为主要内容, 以国家标准的检验程序为主线, 串联各个单元实验。学生经过综合性、连贯性的单元实验训练, 巩固了平板制作、单菌落划线分离、革兰氏染色和油镜观察等实验操作技能; 绝大多数学生能按照国标中的菌落计数原则和步骤, 正确地选择稀释度和计数, 掌握了具有较强应用性的微生物数量研究技术; 学习了形态特征观察、生理生化反应测试、血清学试验和 16S rRNA 基因分析等细菌分类的基本方法, 为开展创新型研究打下了良好的基础。模块化实验教学显著地提升了学生的研究能力, 学生学会了如何着手开展实验课题研究。2013 和 2014 年度我校生物学科共获得了 13 项国家级大学生创新创业训练计划项目, 其中与微生物学相关的项目为 7 项, 占总数的 53.8%。

5 总结

我校水质微生物学检验模块教学采用了基于“生活情境”的教学策略, 围绕学生熟悉的校园湖水水质如何开展实验, 学生普遍具有强烈的学习和研究兴趣。实验内容按照国标制定的方法和程序进行编排, 使学生在微生物检验过程中树立标准化和规范化意识。在实验过程中贯穿微生物分类学知识, 使学生较系统地掌握细菌分类基本方法。采用出具检验报告的形式进行考核, 使该模块具有很强的实用性, 学生能学以致用。

参考文献

- [1] Hong L. The exploration of modular teaching pattern for microbiology experiment in Peking University[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(4): 744-747 (in Chinese)
洪龙. 北京大学微生物学实验课模块化教学的探索[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(4): 744-747
- [2] Zhou YJ, Liu Y, Dai JF, et al. Exploration and practice on the reformation for the microbiology experiment teaching methods[J]. *Microbiology China*, 2009, 36(10): 1609-1613 (in Chinese)

- 周宜君, 刘越, 戴景峰, 等. 微生物学实验教学改革探索与实践[J]. 微生物学通报, 2009, 36(10): 1609-1613
- [3] Dai YJ, He W, Yuan S, et al. The exploration and application of the modular teaching pattern for microbiology experiments[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(9): 1809-1816 (in Chinese)
戴亦军, 何伟, 袁生, 等. 模块化微生物学实验课教学体系的探索与实践[J]. 微生物学通报, 2015, 42(9): 1809-1816
- [4] He W, Xu XS. *The Modular Microbiology Experiment*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2014: 1-117 (in Chinese)
何伟, 徐旭士. 微生物学模块化实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2014: 1-117
- [5] Yuan S, Xu XS, Dai CC, et al. Reform and practice of experimental curriculum in microbiology[J]. *Higher Education of Sciences*, 2012(2): 138-140 (in Chinese)
袁生, 徐旭士, 戴传超, 等. 微生物学实验课程的改革与实践[J]. 高等理科教育, 2012(2): 138-140
- [6] Li FM, Wang SQ, Gong CB, et al. Reform and practice for experimental teaching model for food microbiological analysis[J]. *Microbiology China*, 2008, 35(3): 450-452 (in Chinese)
李凤梅, 王世清, 宫春波, 等. 食品微生物检验实验教学模式的实践与探讨[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 450-452
- [7] Jin YL, E XL, Chen YY, et al. GB/T 5750.12-2006. Standard examination methods for drinking water-Microbiological parameters[S]. Beijing: China Standard Press Publishing House, 2006: 1-30 (in Chinese)
金银龙, 鄂学礼, 陈亚妍, 等. GB/T 5750.12—2006. 生活饮用水标准检验方法 微生物指标[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006: 1-30
- [8] Luo MZ, Zhang JE, Guan WC, et al. The investigation of standardization awareness of college students in Guangzhou[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(4): 448-452 (in Chinese)
罗明珠, 章家恩, 关卫昌, 等. 广州市大学生标准化意识的调查研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(4): 448-452
- [9] He LY, Sheng XF. The exploration and practice of curriculum reform for bacterial taxonomy[J]. *Microbiology China*, 2006, 33(5): 172-175 (in Chinese)
何琳燕, 盛下放. 细菌分类学课程改革的探索与实践[J]. 微生物学通报, 2006, 33(5): 172-175
- [10] Xia XZ, Peng F, Che J, et al. Exploration on innovative experimental item construction for isolation of microorganisms in soil[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(12): 2525-2529 (in Chinese)
夏曦中, 彭方, 车婧, 等. 创新型实验教学项目建设的探索——土壤微生物分离实验[J]. 微生物学通报, 2014, 41(12): 2525-2529