

## 研究型模块实验“产淀粉酶菌株的筛选、发酵条件优化、菌种鉴定和选育”的教学实践

戴亦军 何伟 袁生\* 刘中华 贾永 张石柱

(南京师范大学生命科学学院 江苏 南京 210023)

**摘 要:** 采用模块化形式开展微生物学实验教学可提升学生的学习积极性, 培养学生的探究性学习精神。“产淀粉酶菌株的筛选、发酵条件优化、菌种鉴定和选育”模块实验以产淀粉酶细菌为研究对象, 安排学生开展培养基的配置、土壤样本采集和分离筛选产淀粉酶菌株、产淀粉酶菌株的发酵条件优化、菌种的形态学和分子生物学鉴定、紫外线诱变育种等 5 个单元实验。该模块实验以连贯性的研究任务引导学生进行探究性学习, 将微生物实验操作技能的学习融合于探究性学习过程。实验以学生为主体, 采用“固定+机动”方式安排教学任务, 保证模块实验的整体性和连贯性。采用“模块论文+现场操作考试”的方式进行考核, 提升学生的科研素养和强化学生对微生物基本操作技能的掌握。该研究型模块实验的教学提升了学生的微生物学研究热情, 提高了微生物学课程群的教学质量。

**关键词:** 模块化, 微生物学实验, 产淀粉酶菌株, 菌种鉴定, 菌种选育

## Teaching module for experimental practice on “screening of amylase-producing bacteria, optimization of fermentation conditions, bacterial identification, and strain improvement”

DAI Yi-Jun HE Wei YUAN Sheng\* LIU Zhong-Hua JIA Yong ZHANG Shi-Zhu

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

**Abstract:** The implementation of the experimental research module into microbiology experiment teaching improves undergraduate students' motivation and engagement with inquiry-based learning. In this experimental research module “screening of amylase producing bacteria, optimization of fermentation conditions, bacterial identification, and strain improvement”, students will focus on studies of amylase-producing bacteria, and will be assigned with 5 experimental units that include preparation of culture medium, collection of soil samples and isolation of amylase-producing bacteria, optimization of fermentation conditions of the isolated amylase-producing bacterium, morphologic and molecular

**Foundation item:** The Priority Academic Program Development (PAPD) of Jiangsu Higher Education Institutions; Top-notch Academic Programs Project (TAPP) of Jiangsu Higher Education Institutions

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

Received: April 30, 2016; Accepted: June 17, 2016; Published online (www.cnki.net): August 01, 2016

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 江苏高校品牌专业建设工程资助项目

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

收稿日期: 2016-04-30; 接受日期: 2016-06-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-08-01

identification of bacterial strain, and strain improvement through ultraviolet mutagenesis. This experimental research module will guide students to experience an entire inquiry-based learning process by consistently planning and conducting research projects, through which students will learn and eventually master fundamental microbial experimental skills. This module is student-centered, implemented with “fixed plus mobile” mode, to ensure its integrity and consistency. To improve students’ scientific literacy and basic microbiological techniques, the examination is composed of two parts: scientific paper writing and onsite skills test. Overall, this experimental research module inspires students’ enthusiasm and motivation in learning microbiology; meanwhile it improves the teaching quality of microbiology curriculums.

**Keywords:** Modular teaching, Microbiological Experiment, Amylase-producing bacterium, Bacterial identification, Strain improvement

微生物学实验是高等学校生物科学、生物技术和生物工程专业的重要基础实践课程之一。在微生物学实验课教学中采用创新性、模块化教学方式对于培养高质量的生物学人才具有重要意义<sup>[1-3]</sup>。我校微生物学实验教学采用模块化教学体系。该教学体系由“环境微生物多样性调查”、“产淀粉酶菌株的筛选、发酵条件优化、菌种鉴定和选育”和“水质微生物学检验”3个模块共计12个单元实验组成,每个模块围绕一个科学问题由学生开展探究性学习。课程总学时数为36学时,其中“环境微生物多样性调查”模块安排12学时,在第3周至第6周开展教学;“产淀粉酶菌株的筛选、发酵条件优化、菌种鉴定和选育”模块安排15学时,在第8周至第12周开展教学;“水质微生物学检验”模块安排9学时,在第13周至第14周开展教学。课程于第二学年的第二学期开设,2名学生为一组,每12个组为一个教学班级,全年级200多名学生共组成9个平行班。近几年的探索和实践表明,模块化实验教学非常受学生欢迎,学生普遍反映该课程有助于提升学习微生物学的兴趣,有利于探究能力和实验技能综合运用能力的培养<sup>[4]</sup>。

“产淀粉酶菌株的筛选、发酵条件优化、菌种鉴定和选育”模块实验以产淀粉酶细菌为研究对象,安排学生开展本模块实验所需培养基的配制、土壤样本采集和产淀粉酶菌株的分离筛选、产淀粉酶菌株的发酵条件优化、菌种的形态学和分子生物学鉴定、紫外线诱变育种等5个单元实验。通过本模块实验的学习,学生完整地开展一次应用微生物课题研究的训练,掌握相关微生物学实验技术以及

应用这些技术去解决科学研究和生产实践中的具体问题。经过近几年的不断总结和优化,本模块实验已形成内容成熟、运行流畅的教学体系,达到了培养学生微生物实验技能及其综合运用能力,提高科研兴趣的教学目标。本文介绍了我校在该模块教学中的教学改革和实践。

## 1 教学内容的设计

“产淀粉酶菌株的筛选、发酵条件优化、菌种鉴定和选育”模块共设置了如表1所示的5个单元实验,学生在开展产淀粉酶细菌的研究过程中,学习培养基配制、土壤样品采集、固体平板制备、单菌落划线分离、稀释涂布分离、试管斜面菌种转接与保藏、革兰氏染色和显微镜油镜观察、16S rRNA基因的PCR扩增、诱变育种等微生物学实验操作技术。教学内容的设置体现如下原则。

### 1.1 以连贯性的研究任务驱动学生开展探究性学习

如表1所示,本模块5个单元实验分别设置了5项明确的研究任务。实验一的任务是全班学生共同配制本模块实验所需的各种培养基,以及对培养基和所需的实验器材进行灭菌,如配制用于平板划线和涂布分离的固体淀粉培养基以及用于测定生物量和酶活的不同pH、碳源和氮源的液体培养基等;实验二的任务是各组学生采集不同地点的土壤样本,采用稀释涂布和划线分离法从中分离纯化细菌,采用碘液显色法筛选出具有产淀粉酶能力的菌株;实验三的任务是学生测定不同pH、碳源和氮源条件对实验二分离到的产淀粉酶细菌的生长和

表 1 实验模块的组成及学生需掌握的知识点和微生物学操作技术  
Table 1 The contents, key knowledge and microbial techniques of the modular experiment course

单元实验名称 Experimental units	研究任务 Research tasks	主要的微生物操作技术 Main microbial techniques
实验一 培养基的配制和灭菌 Experiment 1 Preparation and sterilization of culture media	配制本模块实验所需的各种培养基和实验材料的灭菌	试管和三角瓶的包扎和系线方法；培养皿的包扎方法
实验二 产淀粉酶细菌的分离筛选 Experiment 2 Isolation and screening of amylase-producing bacteria	从土壤中分离获得具有产淀粉酶活性的细菌	固体平板制备和倒平板技术；接种环的灼烧方法；单菌落划线分离技术；稀释涂布分离微生物技术
实验三 不同培养条件和培养基成分对产淀粉酶细菌的生长和淀粉酶活性的影响 Experiment 3 The effects of cultural conditions and medium compositions on cell growth and amylase activity of amylase-producing bacteria	研究不同营养成分和培养条件对实验二分离获得的细菌的生长及淀粉酶活力的影响	平板菌种接种试斜面技术；倒平板技术；液体深层培养技术
实验四 产淀粉酶菌株的分类学鉴定 Experiment 4 Identification and taxonomic classification of amylase-producing bacteria	采用形态观察和 16S rRNA 基因序列分析法鉴定实验二分离获得的产淀粉酶细菌	革兰氏染色方法和油镜观察；PCR 仪操作；BLASTn 分析
实验五 产淀粉酶细菌的紫外诱变育种 Experiment 5 Strain improvement of amylase-producing bacteria through ultraviolet mutagenesis	以紫外线为诱变剂对实验二分离获得的产淀粉酶细菌进行菌种选育	倒平板技术；涂布平板技术；斜面转接斜面技术；诱变育种的基本步骤

淀粉酶活性的影响；实验四的任务是用显微镜观察上述菌株的形态，菌落 PCR 扩增其 16S rRNA 基因并对测得的 DNA 序列进行 BLASTn 分析和构建系统发育树；实验五的研究任务是学生接种产淀粉酶细菌菌株于液体淀粉培养基中，长至对数生长期后，稀释涂布平板并进行紫外线照射、避光培养后计算存活率，分析紫外线诱变对菌株产淀粉酶活性的影响。本模块实验的具体研究流程如图 1 所示。学生以自己分离的产淀粉酶菌株为研究对象，通过菌种的纯化、培养和保藏(图中虚线所示)串联各个单元实验内容，使 5 个单元实验组成了一个完整的、连贯性模块实验。学生在探究性学习过程中，完成菌种的分离、培养优化、菌种鉴定和菌种选育等研究任务，掌握微生物学实验操作技能，了解功能微生物研究的基本原理和方法、具体工作流程等。

## 1.2 微生物学实验操作技能的学习融合于探究性学习过程

“产淀粉酶菌株的筛选、发酵条件优化、菌种鉴定和选育”模块实验没有单独开设专门的微生物操作技术训练实验，而是将其融合于产淀粉酶菌株课题研究之中，学生在开展课题研究的过程中掌握

各项微生物学实验技能以及学会运用这些技术去解决实际问题。如单元实验二由学生采集土壤样品，制备好土壤浸悬液后，采用分区划线法进行单菌落分离，同时对土壤浸悬液进行梯度稀释并选择其中两个稀释度的样品涂布平板和分离单菌落。在单元实验三和实验五中学生还要再次练习倒平板、分区划线分离纯化菌种和稀释涂布用于紫外线照射的菌株。这样的教学设计可让学生反复练习，达到熟练掌握重要微生物学基本操作技能的效果。

## 1.3 加强与微生物学理论课的联系

“微生物学实验课”作为一门独立实践课程，与微生物学理论课平行开设，在理论课开始教学后的第三周开课。实验课与理论课相呼应，理论指导实践，实践验证理论，有助于学生理解和掌握微生物学的理论与方法<sup>[5]</sup>。第一模块“环境微生物多样性调查”实验内容对应于理论课中的原核微生物、真核微生物和病毒章节内容；第三模块“水质微生物学检验”实验内容对应于理论课的微生物代谢(主要是生化反应)和微生物感染与免疫章节内容；本模块实验即第二实验模块的内容对应于理论课的微生物营养与生长、微生物代谢和微生物遗传章节内容。

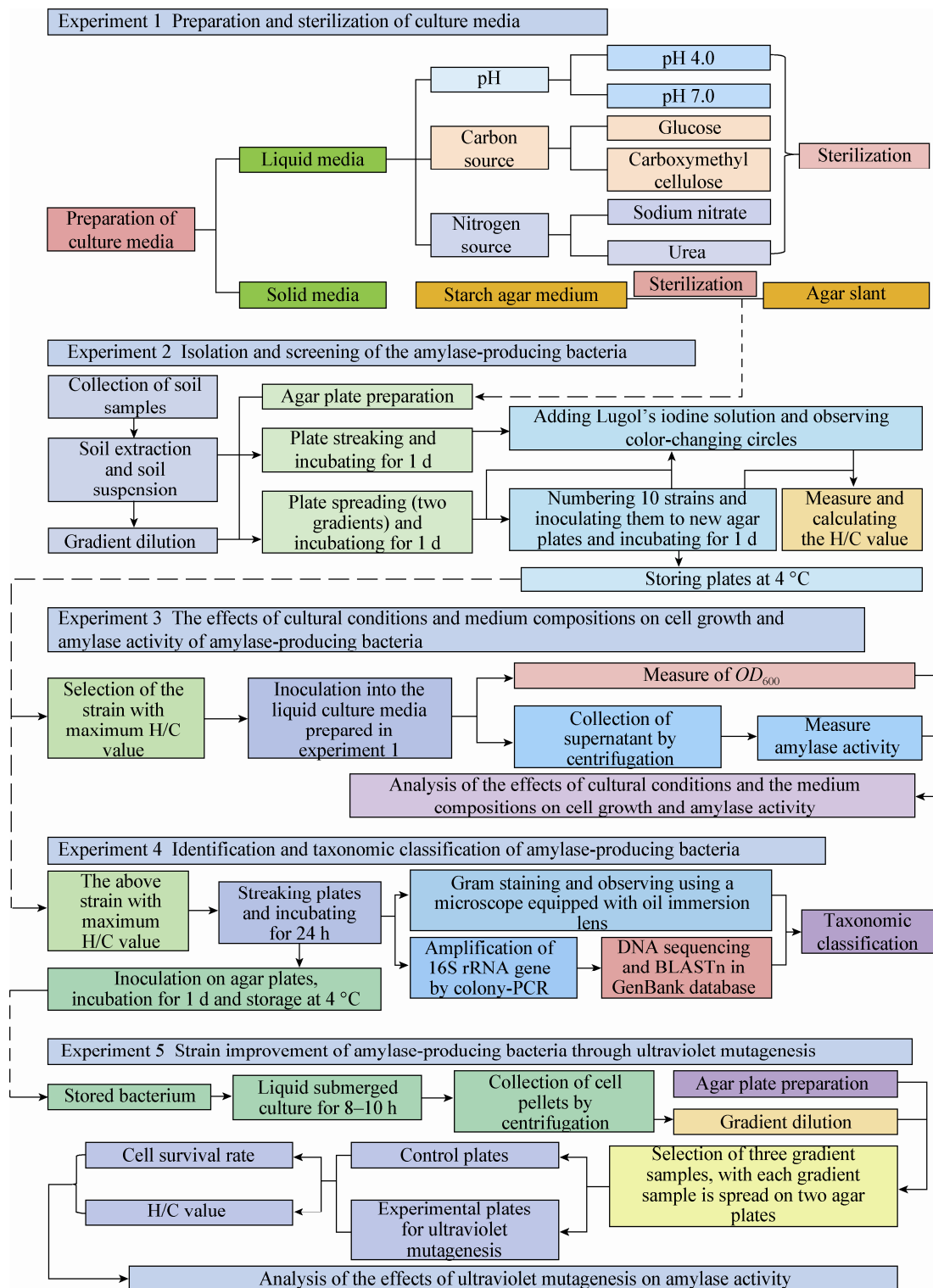


图1 “产淀粉酶菌株的筛选、发酵条件优化、菌种鉴定和选育”模块的研究流程

Figure 1 The studying process of the module “the screening of amylase-producing bacteria, optimization of fermentation conditions, bacterial identification and strain improvement”

为协调实验课与理论课进度相一致的问题,在实验二和实验四分别设置了菌种保藏环节(图 1),指导教师通过调整菌种保藏时间来灵活地调节单元实验三、四和五的开课时间,这样既协调了实验课与理论课教学进度,又保证了实验的延续性。

学生在本模块的学习过程中,可巩固理论课所学的灭菌、培养基组成、细菌生长与营养之间的关系、核糖体和 16S rRNA 基因、光修复等微生物学知识点。如在单元实验一“培养基的配制与灭菌”中,学生分别配制 pH 4.0 和 7.0、碳源分别为葡萄糖和羧甲基纤维素、氮源分别为尿素和硝酸钠的液体培养基,在单元实验三中学生接种实验二分离的产淀粉酶细菌,培养一段时间后,测定光密度值  $OD_{600}$ 。学生通过分析比较不同 pH、碳源和氮源对菌体生物量的影响,从而加深对培养基组成的认识和对微生物生长与营养物质之间关系的理解。在单元实验五“产淀粉酶细菌的紫外诱变育种”中,学生涂布平板后,需要在红光下进行紫外线照射操作以及将平板避光培养,这样的实践有助于学生强化对光修复和微生物遗传育种基本原理的认识。

## 2 教学内容的实施

为保证实验过程的连续性和学生的实验主体性,本模块实验要求学生提前到实验室进行菌种活化和接种等工作以及实验结果的后续观察,因此合理安排好学生的实验内容、实验时间和实验场地,对于保证研究性实验的教学效果至关重要。“产淀粉酶菌株的筛选、发酵条件优化、菌种鉴定和选育”模块以周次单元实验的形式进行教学,具体教学安排见表 2。以周三开展实验的班级为例,配制培养基、采集土样和菌种分离、测定发酵液的生物量和淀粉酶活性、形态观察及 PCR 扩增,紫外诱变育种等实验主体内容安排在周三固定时间开展。在该固定教学时间内,人力、物力和场地均有充分保障。菌种活化、接种、划线培养等提前至周二进行,培养 1 d 后,正好用于周三的主体实验。周三涂布的平板培养 1 d 后,于周四进行滴加碘液显色、观察

水解圈和测量水解圈大小。周二和周四的实验时间一般不超过 30 min,具体时间点由任课教师和学生协商而定。这种“固定+机动”实验时间的教学安排一方面可保证模块实验的整体性和连贯性,为学生创立了探究性学习的情境;另一方面可强化学生的实验主体性,在教师的指导和引导下,学生自己完成土壤样本采集、菌种分离和纯化、淀粉酶功能验证、培养条件和培养基组分优化、菌种的诱变育种等全部实验操作。

## 3 考核

本模块的考核采用撰写模块实验论文和操作考试相结合的方式。撰写论文是要求学生在该模块全部实验结束后,按照研究论文的格式撰写一篇论文,而不是在每个单元实验结束后分别提交一篇实验报告。本模块论文成绩与其他两个模块论文的成绩组成学生论文综合成绩,占课程总评成绩的 50%。论文评价要素包括:(1) 论文格式是否符合研究论文写作规范。提交的论文是否按前言、材料与方法、结果、讨论和参考文献的格式撰写,材料和方法是否进行了整合;(2) 实验结果的整理和整合。包括表格是否采用三线表,图片是否进行了恰当的标注,如 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果图是否对泳道进行了标记,是否对 DNA marker 的长度进行了注释,多结果的图片是否进行整合并分别标注;(3) 实验结果的讨论与分析。特别是学生是否就不成功的实验结果进行思考和寻找原因,因为思考能力是创新型人才极其重要的能力之一。

微生物学实验教学的根本目标是使学生掌握基本实验操作技能。与验证性实验相比,研究型模块的实验操作技术揉合在学生开展课题的研究过程中进行传授。为避免学生重研究轻实验技术的掌握,实验课的考核采用“一对一”的形式进行现场操作考试。考试题目内容涵盖 3 个模块实验,由学生随机抽取,学生按考题要求进行实践操作,全体实验指导教师观察学生的操作规范性并分别给每位考生打分,然后计算出平均成绩。该成绩占总评成绩的 50%。

表 2 实验模块的教学安排  
Table 2 The teaching arrangement of experimental modules

单元实验 Experimental units	星期二 Tuesday	星期三 Wednesday	星期四 Thursday
实验一 培养基的配制和灭菌 Experiment 1 Preparation and sterilization of culture media		配制本模块实验所需的固体培养基和不同 pH、碳源和氮源和液体培养基;生理盐水、培养基、移液管、枪头、培养皿的灭菌	
实验二 产淀粉酶细菌的分离筛选 Experiment 2 Isolation and screening of amylase-producing bacteria		学生课前采集土样;制备土壤浸悬液并进行梯度稀释;制备平板固体培养基;选取两个稀释度的样品涂布平板;土壤浸悬液分区划线于淀粉培养基平板;平板倒置培养	平板上选取单菌落并编号;用无菌牙签点种到新的淀粉培养基上;原平板滴加碘液,观察水解圈并测量和计算 H/C 值;点种平板培养 1 d 后保藏于 4 °C
实验三 不同培养条件和培养基成份对产淀粉酶细菌的生长和淀粉酶活性的影响 Experiment 3 The effects of cultural conditions and medium compositions on cell growth and amylase activity of amylase-producing bacteria	选取实验二测得 H/C 值最大的菌种接种至无菌生理盐水中,振荡打散后,按每瓶 0.5 mL 接种于实验一配制的液体培养基中,30 °C 振荡培养 24 h	周二的培养液稀释适当倍数后,测定 OD <sub>600</sub> ;采用碘显色法定量测定发酵液水解淀粉量,计算淀粉酶酶活;挑取目标菌落并在平板培养基上分区划线,30 °C 培养	平板培养 1 d 后保藏于 4 °C
实验四 产淀粉酶菌株的分类学鉴定 Experiment 4 Identification and taxonomic classification of amylase-producing bacteria	从实验三保藏的平板上挑取单菌落,分区划线于淀粉培养基平板上;在原平板上铺碘液,验证所选菌株是否具有产淀粉酶的能力	革兰氏染色和油镜观察菌体形态;菌落 PCR (Colony PCR)扩增 16S rRNA 基因;琼脂糖凝胶电泳;阳性样品送测序;从淀粉划线平板上挑取一环菌苔,转接试管斜面并培养 1 d	试管斜面保藏于 4 °C
实验五 产淀粉酶细菌的紫外诱变育种 Experiment 5 Strain improvement of amylase-producing bacteria through ultraviolet mutagenesis	实验四保藏的试管斜面菌种转接至另一支试管斜面;挑取菌体并用无菌生理盐水制备菌悬液后,接种含液体淀粉培养基的摇瓶	离心收集菌体并悬浮于无菌生理盐水中;梯度稀释至 10 <sup>-8</sup> 稀释度;取 10 <sup>-6</sup> 、10 <sup>-7</sup> 和 10 <sup>-8</sup> 稀释度的样品各涂布两块平板;其中一组于紫外灯下照射,另一组为对照;所有平板置于 30 °C 避光倒置培养	菌落计数并计算致死率和存活率;平板中滴加碘液,测量淀粉水解圈直径与菌落直径并计算 H/C 值;与对照组结果进行比较

4 教学效果

4.1 激发学生参与科研的热情

对微生物学实验教学效果的调查结果表明,学生非常喜欢研究型、模块化微生物学实验,认为实验内容系统性强、学习目标明确、任务充足,通过微生物学实验课的学习提高了实验动手能力和树立了创新思维意识,学会了如何开展一个课题的研究。另外,学生在上微生物学实验课时,正值学校组织大学生创新创业训练项目申报,学生如能筛选

到淀粉水解圈和菌落直径比值较大的细菌或产淀粉酶的真菌,可组成实验团队申请大学生创新创业训练项目,进入导师实验室开展进一步的生理生化反应、18S rRNA 基因序列分析、形态特征观察等鉴定菌种、菌种的生物学特性、发酵性能及优化、淀粉酶基因克隆和表达等研究。研究型模块实验教学极大地激发了学生参与科研的热情,2013-2015 年我校生物学科共获得了 19 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有

8 项, 占总数的 42.1%。

#### 4.2 提升微生物学课程群的教学质量

我校生物技术专业设置了微生物学、微生物学实验、微生物工程、酶工程和啤酒生产实训等与微生物学相关的课程群。这些课程之间具有微生物学知识和技能累加的内在联系, 如微生物菌种的选育和培养基优化是微生物学生物技术中最重要的工作之一, 在所有微生物学相关的课程中都会涉及。学生由于亲历了产淀粉酶菌株的筛选和选育、培养条件优化等实践学习, 更容易理解微生物工程课程中“工业微生物菌种筛选和选育”和“双酶水解法制备淀粉糖”以及啤酒生产实训课程中的“糖化工艺”等教学内容。教师采用关联教学法, 能促进学生对微生物学知识体系的融会贯通。另一方面, 微生物学实验课教学团队会针对每个单元实验开展教学研讨会, 年青教师在参加教学研讨的过程中快速成长, 教学水平不断提高, 从而推动了微生物学课程群的教学质量的提升。如何伟副教授主编了高等教育出版社出版的《微生物学模块化实验教程》教材并主持了江苏省教育教学改革项目<sup>[6]</sup>。

## 5 总结

“产淀粉酶菌株的筛选、发酵条件优化、菌种鉴定和选育”模块实验将土壤中产淀粉酶细菌的分离和纯化、菌种形态观察和 16S rRNA 基因序列分析鉴定菌种、培养条件优化和诱变育种等一系列实

验整合成研究型、模块化实验。学生在开展探究性学习过程中掌握微生物学实验操作技能。实验过程突出学生的学习主体地位。这些教学改革有效地增强了学生的主人翁意识和责任感, 激发了学生的研究兴趣, 有利于培养生物科学创新型人才。

## 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] 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
- [3] Liu ZW, Qu NR, Gao DW. Opening experiment of microbiology[J]. Microbiology China, 2011, 38(1): 118-122 (in Chinese)  
刘志伟, 屈年瑞, 高大威. 微生物学开放性实验的探索与研究[J]. 微生物学通报, 2011, 38(1): 118-122
- [4] 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
- [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] 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