

激发学生好奇心，提升微生物学实验教学效果

彭方* 谢志雄 李文化 夏曦中 车婧 谢畅 唐晓峰

(武汉大学生命科学学院 湖北 武汉 430072)

摘要: 好奇心是研究和学习的动力，为了在微生物学实验课程中激发并延续学生的好奇心以提高教学效果，我们尝试将“环境微生物的检测”实验与微生物的鉴定结合起来，使学生在“环境微生物的检测”实验中引发的好奇心、热情和兴趣通过鉴定自己分离的菌株而得以延伸，贯穿到整个学期的微生物学实验中。促使学生积极、主动、认真地完成每一个实验，从而加深学生对主要的微生物学实验知识点的理解和实验技能的掌握。而且，在这样的综合实验中，教学实验与科研相衔接，有利于培养学生的基本科研能力和创新精神，取得了较好的教学和科研成果。

关键词: 好奇心，环境微生物检测，微生物鉴定，微生物学实验

Stimulate students' curiosity and enhance the effectiveness of Microbiology Experimental teaching

PENG Fang* XIE Zhi-Xiong LI Wen-Hua XIA Xi-Zhong CHE Jing XIE Chang
TANG Xiao-Feng

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

Abstract: Curiosity is the driving force of research and learning. Our aim is how to stimulate and continue students' curiosity in Microbiology Experiment courses to improve teaching effectiveness. We attempt to combine "Detection of environmental microbes" with microbiological identification to comprehensive completion of the major Microbiology experiments. The curiosity, enthusiasm and interest excited from "Detection of environmental microbes" experiment were throughout the microbiological experiments by using microbiological identification. Consequently, the students were promoted to practice actively, initiatively and diligently in every experiment, and to deep understand the experimental knowledge and mastery of experimental skills. This combination between experiment teaching and extracurricular research contributes to cultivate students' basic scientific research ability and innovative spirit, and to obtain the better teaching effect.

Keywords: Curiosity, Detection of environmental microbes, Microbiological identification, Microbiology Experiment

Foundation items: Hubei Provincial Department of Education to Wuhan University Teaching Reform Funding Project (JG2014033); Wuhan University Experimental Teaching Center Open Experimental Support Project

*Corresponding author: Tel: 86-27-68752056; E-mail: pf-cctcc@whu.edu.cn

Received: July 20, 2017; **Accepted:** September 19, 2017; **Published online** (www.cnki.net): October 16, 2017

基金项目: 湖北省教育厅武汉大学教学改革资助项目(JG2014033); 武汉大学实验教学中心开放实验资助项目

*通信作者: Tel: 86-27-68752056; E-mail: pf-cctcc@whu.edu.cn

收稿日期: 2017-07-20; 接受日期: 2017-09-19; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-10-16

“环境微生物的检测”是许多高校开设的第一堂微生物学实验课，其主要目的是让学生建立牢固的“无菌概念”，严格无菌操作。学生们第一次在平板上惊奇地看到了围绕自己身边，甚至自己身上的各种各样令人眼花缭乱的微生物菌落，面对这些“冒出来”的陌生者，一种天然的好奇心会油然而生。这是一种十分可贵的好奇心，这种好奇心正是学生认识事物、探究奥秘、开启创造力的巨大动力，是产生浓厚兴趣的直接原因。遗憾的是，往往在学生做完实验、洗掉平板后，这一开篇实验也就结束了，无意间泯灭了这种刚刚被激发的好奇心。因此，教师如何在教学中使这种好奇心保持下去？如何通过具体的教学实践将好奇心贯穿始终，使学生保持极大的学习热情和主动性去探索这个他们还未知的微观世界？我们一直在实验教学中思考着和实践着。

随着现代测序技术和生物信息学的迅猛发展，微生物的初步鉴定作为本科生实验已成为可能。微生物鉴定实验的开展不仅可以使学生获得物种鉴定和生物信息学方面的技能和知识，还可以将普通微生物学实验的内容，比如培养特征、显微形态观察、生理生化特性等通过物种鉴定这一目标而串联起来成为一个整体。而用什么作为受试菌株呢？由老师提供，还是由学生自己分离？我们在进行“环境微生物的检测”实验教学中，学生们的好奇心启发了我们，因此决定尝试着将“环境微生物的检测”与微生物的初步鉴定结合起来进行教学。让学生选取自己获得的感兴趣的未知微生物作为实验材料，与已知的实验菌株一起进行革兰氏染色、鞭毛染色、生理生化特性、抗生素抗性等普通微生物学实验，以完成未知菌株的鉴定。实践结果表明，这样的结合不仅能将学生的好奇心、热情和兴趣延续，还可以让学生了解细菌的初步鉴定方法以及菌种保藏的知识，并扩展成为课外科研内容。学生在鉴定自己分离获得的未知菌株的过程中，也更主动地学习和反复练习微生物的无菌操作技术和实验技巧，以期获得鉴定结果，从而也促进了整个实验教学的开

展，获得了较好的实验教学效果。我们的具体做法总结如下。

1 明确实验的性质和目的

微生物鉴定实验是通过多相分类学的方法对细菌进行鉴定，该方法主要指应用从分子到生态学指标，包括表型、遗传型和系统发育等多方面的信息对细菌进行全面的分类研究。学生自己选取未知菌株，通过与已知实验菌株(日常教学菌株)一起同步完成微生物学实验中关于微生物显微形态观察、生理生化检测、16S rRNA 基因 PCR 扩增及序列分析等实验对未知菌株进行鉴定。

该实验具有基础性、综合性、科研性和未知性，在最后的鉴定结果出来之前，学生自己分离的菌株其种类是未知的，因此在好奇心的驱动下，学生在整个实验过程中具有很强的积极性、主动性和严谨性。教师的职责首先是要对学生的热情和积极性进行引导，使学生明确该实验的性质、目的和要求，强调其“实战性”，使学生明确最终的实验结果正确与否取决于自己在整个实验过程中每一个环节、每一个实验是否正确；其次是明确指出实验中要学习和掌握的关键技术，如无菌操作技术、细菌的分离和保藏、细菌鉴定的基本检测方法、细菌鉴定涉及的生物信息学方法等。

2 合理安排实验进程和操作

微生物鉴定实验贯穿整个普通微生物学实验课，只是在开设原有教学实验时，除了检测已知教学菌株外，同时检测学生自己选择的受试菌。教学时要注意对学生加以引导，使学生保持其好奇心，对取得好的、正确的实验结果充满信心。此外，在原有课时基础上需另外增加一个3学时的细菌基因组提取及16S rRNA 基因 PCR 扩增实验。本文所涉及并引用的实验均可见于高等教育出版社出版的《微生物学实验》(第4版)^[1]。

2.1 环境微生物的检测与细菌的分离纯化及保藏

学生可按照“无菌概念和无菌操作技术”从不同环境中取样分离和富集未知的微生物，获取环境中

微生物的纯培养物。在该实验中, 教师要在下列 4 个方面提醒和指导学生: (1) 取样时一定要避免从可能混杂病原微生物或条件致病菌的环境进行取样, 比如医院或动物尸体等; 在进行实验和处理废弃物时要特别小心, 防止病原微生物感染或污染环境。(2) 当学生拿到从自己感兴趣的环境中获得的长有各种微生物菌落的平板时, 指导学生进行仔细观察, 认真记录, 并根据取样环境进行分析, 对学生由此产生的好奇心给予引导。(3) 要求学生根据所学知识分辨出细菌菌落, 挑选细菌单菌落作为受试菌株(因本实验是以细菌为例), 并命名菌株号, 认真仔细地记录菌落形态、样品来源、培养条件。培养学生及时、真实记录原始实验数据的好习惯。(4) 强调进一步纯化和保藏的重要性, 一定要对学生强调, 对一个不纯的菌进行鉴定, 其后果只能是“一系列错误”。因此, 必须严格按照“微生物分离与纯化”技术, 挑取单菌落在牛肉膏蛋白胨琼脂平板上用四区划线法进行纯化。仔细观察四区划线平板上的单菌落是否符合原始菌落的记录特征, 挑取形态良好的单菌落接种到牛肉膏蛋白胨琼脂斜面, 并向学生强调一定要接种 A、B 两支斜面, 做好标记。经培养并进一步观察无误后, 将一支斜面 A 放置于 4 °C 冰箱保藏, 作为备用菌种。另一支斜面 B 用于后期实验, 实验间期置于 4 °C 冰箱保藏。

学生比较倾向于对自己周边环境进行检测, 因此, 需要准备一些消毒棉签和无菌水, 指导学生如何从物体表面或身体(耳、鼻、口、皮肤)表面采样。辨别平板上生长的菌落时, 比较难辨别的是酵母菌和细菌以及放线菌和霉菌的差别, 而鉴定体系是针对细菌的, 所以是否能正确辨别直接影响鉴定结果, 这必然迫使学生结合书本知识认真仔细地进行观察和判断。显微镜镜检有利于这几种菌的辨别, 于是学生更能理解镜检的必要性, 并通过镜检判断是否纯种。若为混合菌, 学生也会积极要求利用四区划线法进行纯化, 从而锻炼其无菌操作能力。当菌的形态或染色效果不好时, 引导学生意识到可能是菌龄的问题, 从而重视菌株的活化和保藏。

2.2 对受试菌株进行鉴定

对细菌的鉴定需要运用多相分类学的方法, 主要包括表型和系统发育等方面的信息。所谓表型主要指菌的形态、运动特征、培养以及生理生化特性等; 系统发育则指菌株 16S rRNA 基因序列的测定比对以及进化树的构建^[2]。而受试菌的鉴定恰好可以结合微生物学实验教学中通常开展的一些实验进行, 既学习了鉴定的知识技术, 又能够将单个的教学实验串连起来, 加深学生的理解。

2.2.1 受试菌株的形态特征和生理生化鉴定

结合微生物学教学实验课的内容, 对已知的教学菌株进行实验的同时进行受试菌的检测。比如, 微生物学实验课程一般都会开设的革兰氏染色、芽孢/鞭毛/荚膜染色、运动性观察以及生理生化等试验, 要求学生详细记录受试菌和实验用教学菌株的结果, 并以教学菌株为对照分析判断受试菌株检测结果的正确性, 从而获得受试菌的形态和生理生化特征。由于对受试菌感兴趣, 学生常会发现和提出一些有趣的问题, 比如: 为什么都是革兰氏阳性菌, 不同菌种却有染色深浅的差异, 与肽聚糖层的厚度和结构相关吗? 球状菌是否都没有芽孢呢? 生理生化特性是否与培养条件相关? 这些都可以引导学生查阅资料或设计实验进行探索。这里需要注意的是, 若镜检发现受试菌菌株不纯, 则需要再次平板划线获得纯化菌落重新开始。此外, 根据实验课的内容还可以对受试菌进行抗生素敏感性、蛋白酶或淀粉酶酶活的检测以及碳源利用等实验, 生理生化特性检测也可利用快速检测卡, 比如 API 20NE 等。通过这些实验有可能获得具有潜在应用价值的菌株, 比如产蛋白酶、淀粉酶、脲酶以及能够进行反硝化作用的菌株等, 可用于学生后续的课外科学研究。在获得受试菌的表型检测结果后可以引导学生通过查找文献或电子图书如《伯杰氏系统古菌和细菌学手册》(*Bergey's Manual of Systematic of Archaea and Bacteria*, <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9781118960608>)推测菌株可能的分类地位, 进一步激发学生的好奇心。

2.2.2 对受试菌株进行 16S rRNA 基因序列测定及分析

这部分实验主要涉及模板 DNA 的制备和 PCR 扩增两项主要实验技术,可按《微生物学实验》(第 4 版)^[1]中描述的方法进行。这里需要注意的是在制备模板 DNA 时,只需用接种环取受试菌 B 斜面上菌苔 2-5 环于装有 1 mL 无菌水的 EP 管中,至肉眼可见的混浊即可(菌量过多会导致杂质量大,不利于后期实验,量少则无法提供足够的 PCR 模板量)。菌液经 12 000 r/min 离心 2 min,彻底去除上清液,加 100 μ L 无菌水充分悬浮菌沉淀,置沸水浴 15 min,12 000 r/min 离心 2 min,获上清液作为 PCR 模板。

在 PCR 扩增实验中,将 2 μ L PCR 模板 DNA 加入到 48 μ L 的 PCR Mix 溶液中进行 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增后,经琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,注意选取具有正确分子量及单条带的合格样品送测序公司进行 16S rRNA 基因测序。若不能获得正确的 PCR 产物条带,则按照书中“分子微生物学基础技术(实验 30 细菌总 DNA 的制备)”中描述的方法提取细菌基因组进行 PCR 扩增。目前,测通一条 16S rRNA 基因序列的费用并不高,估计大多数学校可以操作。如果经费有限,可以只测一端,或多人一组选取少数有特色的菌株进行测序。

在获得测序文件后,指导学生查看测序文件,若测序峰单一,无杂峰,即可按《微生物学实验》(第 4 版)^[1]中的附录“利用互联网和计算机辅助基因分析鉴定古菌和细菌”中所述,进行序列拼接。然后将获得的受试菌 16S rRNA 基因序列利用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站或 EzBioCloud 网站(<http://www.ezbiocloud.net/>)进行序列比对,下载比对结果的 FASTA 文件。利用 MEGA 6.0 软件载入 FASTA 文件,对受试菌的序列及其同源序列构建进化树。根据序列比对结果和进化树构建结果,分析受试菌的可能分类地位。如果与已知模式菌株序列比对结果小于 97%,那么这株受试菌极有可能是潜在的新分类单元,鼓励学生到专业的分类学实验室进行后续分类学研究。若序列相似性

大于 97%,可以引导学生进行讨论,其形态和生理生化结果是否与最相似的已知菌株特性一致。若有较大差别,有可能这株菌仍是潜在的细菌新物种,也有可能是测试方法不当或不足引起的,从而引导学生讨论要开展哪些研究去进一步验证。

2.2.3 受试菌株的实验结果分析及初步鉴定

指导学生根据受试菌 16S rRNA 基因序列比对结果和进化树的分析结果,判断其可能归类的门属分类单元,通过《伯杰氏系统古菌和细菌学手册》或网站 <http://www.bacterio.net/>查找并获知相关菌株的特性和参考文献。将受试菌的形态观察和生理生化结果与参考文献中的信息进行比较分析,根据分析结果,对受试菌进行初步鉴定,并提出可能进一步需要开展的实验。此时可以引导学生查阅受试菌所在种属菌株已有的研究资料,讨论其与环境 and 人类的相互关系,以及可能的潜在科学研究或应用价值,使学生对深入研究自己获得的受试菌产生好奇心和兴趣。比如,从实验室空气中分离到的云南微球菌特别多,那么这种菌哪些特征或已有的研究能够解释其适应性呢?这种菌的已知分布和扩散性如何?是否可能条件致病?为何身体体表较少分离到这种菌?实验室如何进行消毒灭菌?通过提问和讨论的方式引导学生进行思考和探究。

按照教材附录“微生物菌种保藏”所述,选取与已知细菌相似度低或有特殊性状、特殊功能的受试菌进行冷冻干燥保藏,为后续可能的课外科研保存材料;并对学生强调菌株保藏和活化的重要性,由学生准备自己的受试菌株,在单个实验开始前应对受试菌株进行转接活化,使其充分意识到生物实验材料准备的必要性和关键点。

3 实验结果及其评定

除要求学生以表格形式详细记录受试菌检测结果并给出受试菌的拉丁学名外,还要求学生注意实验过程中数据和图片的收集,培养学生仔细观察实验、随时记录并收集保留实验结果和图片的科研习惯。受试菌株的初步鉴定结果可以以小组为单位

通过 PPT 的形式进行展示, 由全体学生提问和讨论, 给出评价和分数。

4 取得的教学效果和实际成效

通过将“环境微生物的检测”与微生物的初步鉴定结合起来进行教学, 将学生的好奇心、积极性和主动性贯穿于整个实验过程, 教学成果显著, 不仅使学生很好地建立了无菌概念, 自觉地严格无菌操作, 而且在这种既具有基础性, 又具有实战性、科研性的综合实验中, 学生更好地理解 and 掌握了微生物学实验主要知识点和基本实验技能, 获得了实际成效。

4.1 获得了一批具有应用价值的菌株

通过此项教学改革, 学生在对实验室、空气、土壤、体表、手机、眼镜、空调、饮水等周边环境进行采样和分菌过程中获得了一些具有蛋白酶、淀粉酶、半乳糖苷酶、纤维素酶等酶活的菌株, 以及具有分泌多糖、降解色素、反硝化作用、杀虫、拮抗真菌的菌株。比如, 从一位学生舌头上分离获得了一株沙雷氏菌, 查找文献发现它具有杀虫作用, 学生对其进行初步研究发现它对线虫的孵化和生长都有明显抑制和杀灭作用; 而有的学生在检测实验室空气的平板上发现一个细菌菌落对周边生长的霉菌有抑制作用, 将其进行鉴定后确定为一株芽孢杆菌, 其可抑制黑曲霉、青霉和旋孢腔菌。这些菌株不仅为学生进行课外科研提供了材料和课题, 还被收录到中国典型培养物保藏中心的菌种目录中, 成为社会可以共享的资源。其中能够产生色素和具有明显真菌拮抗作用的菌株还被用于“共享杯”大学生科技资源共享服务创新大赛的微生物绘图和新的教学试验中。

4.2 获得了一批新的菌种

在受试菌的初步鉴定过程中, 若获得其 16S rRNA 基因的序列与已知菌种的序列同源性小于 97% 则认为是潜在的新分类单元。通过鼓励学生进行深入的多相分类学实验, 完成新物种的鉴定、分类和命名。2014–2016 年, 以本科生为第一作者或参与作者在国际刊物 IJSEM (*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*) 上发表了 8 篇关于新菌

种的文章, 包括 2 个新属(鞘氨醇橙色菌、李胜斌菌) 以及其他 6 个属(黏液杆菌、玫瑰单胞菌、金黄杆菌、苍黄杆菌、螺状菌、薄层菌) 的 8 个新种 (*Sphingoaurantiacus polygranulatus*、*Risunbinella pyongyangensis*、*Mucilaginibacter antarcticus*、*Roseomonas arcticisoli*、*Chryseobacterium frigidum*、*Luteolibacter arcticus*、*Spirosoma arcticum*、*Hymenobacter arcticus*)。

4.3 培养了学生的科研能力和创新精神

通过将本实验课与学生的课余科研相结合, 使实验课成果和激发的好奇心得以延伸。在 2014–2016 年期间, 学生们利用自己分离获得的特色菌株和相关信息申请到国家大学生创新创业训练项目共 8 项, 校级大学生创新项目 10 项。对受试菌的功能研究申请专利 1 项。获得“共享杯”大学生科技资源共享服务创新大赛(国家科技基础条件平台中心主办) 2 项优秀奖和 1 项三等奖。比如, 因为实验课上对极地土壤中受试细菌的兴趣, 3 位本科生组成了一个课外科研小组, 他们从南极土壤样品中分离获得了三百余株细菌, 其中的一个新菌种已经在 IJSEM 杂志上发表(另外两篇在投); 他们对这些菌株进行了功能筛选, 获得大量产生低温酶类的菌株, 其中一株产低温半乳糖苷酶的菌株已经申请专利, 而结合菌株鉴定和功能筛选的研究论文“南极南设得兰群岛地区可培养微生物多样性的研究”在“共享杯”大学生竞赛中获得三等奖。目前这 3 位同学都已经被免推到中国科学院和知名高校在读研究生。

通过此项教学改革, 学生充分了解了各项实验技术的重要性, 为了获得可靠的初步鉴定结果, 主动要求重复实验。当实验结果与文献不同时也能查找资料, 尝试多种方法进行验证, 获得 2016 年“内蒙古大学杯”首届全国大学生生命科学创新实验大赛二等奖 1 项、湖北省高等学校第三、四届大学生生物实验技能竞赛一等奖 6 项和二等奖 1 项。

5 结语

本实验的目的不仅在于讲授微生物的鉴定方

法,更主要的是激发学生的好奇心、研究兴趣和主动学习的热情。以鉴定为目标,将好奇心贯穿到主要的微生物学实验知识点和实验技能中,加深学生对各实验知识点的理解和实验技能的掌握。学生对于存在于自己身边的微生物有极大的好奇心,在这一好奇心的推动下,为了最终鉴定出微生物的种类会认真进行各项实验,不可预知的结果总能带来动力和惊喜;为了保持菌株的纯度,学生会更注意无菌操作技术的掌握,常常主动要求进行平板划线以纯化菌株,主动要求重复实验,也更能理解对微生物纯度、保藏、新鲜性要求的必要性。同时,本教

学改革促进了学生对环境与微生物相关性的思考,加强了他们对微生物学知识技术的理解和拓展,从而获得了最佳教学效果和实际成效。

REFERENCES

- [1] Shen P, Chen XD. Microbiology Experiment[M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2007 (in Chinese)
沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 4版. 北京: 高等教育出版社, 2007
- [2] Tao TS, Yang RF, Dong XZ. Systematics of Prokaryotes[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007 (in Chinese)
陶天申, 杨瑞馥, 东秀珠. 原核生物系统学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007

2018年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(3-3)

序号	会议名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
28	噬菌体理论与应用研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	9月	200	辽宁大连	徐永平 13940930111
29	2018年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	10月19-23日	800	江西南昌	杨海花, 王旭 010-64807200
30	第十三届全国土壤微生物学术讨论会暨第六届全国微生物肥料生产技术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	10月	350	上海	马鸣超, 姜昕 010-82108702
31	2018工业生物过程控制研讨会	中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会	10月	200	浙江杭州	夏建业 13761030390
32	第三届全国病毒学青年学者学术研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	11月	300	福建福州	吴莹
33	第三届合成微生物学与生物制造学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	11月	300	上海	张立新 021-64252575
34	第十三届全国芽孢杆菌青年工作者学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	11月	200	天津	蔡峻 caijun@nankai.edu.cn
35	第一届全国根际微生物学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	11月	200	山东泰安	杜秉海 du_binghai@163.com
36	第二十一次全国环境微生物学学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11月	600	广东汕头	胡忠 hzh@stu.edu.cn
37	2018年酿造分会学术年会	中国微生物学会酿造分会	11月15-16日	150	湖北武汉	高洁
38	中国微生物与白酒酿造技术研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	12月	150	待定	010-53218310
39	幽门螺杆菌谷氏快速分离培养、鉴定、药敏试验试剂盒应用培训班	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	12月	50	浙江宁波	曾雯琪 0574-87035856
40	第七届全国微生物基因组学学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	12月	200人	江西南昌	龙中儿, 杨慧林 0791-88121571
41	2018年生物制品年会	中国微生物学会生物制品专业委员会	待定	1000	待定	毛群颖 18810054059