

# 微生物学大实验模块“天然酵母菌的筛选、扩大培养和鉴定”的教改研究与实践

梁宝东, 魏海香, 朱九滨, 张爱民\*, 刘亚斌 (济宁学院生命科学与工程系, 山东济宁 273155)

**摘要** 以“天然酵母菌的筛选、培养和选育”为主线, 设计了一个由4个相互关联、前后衔接一体的实验组成的综合性研究型实验模块, 进行教学实践与改革。实验模块主要包括: 培养基的配制、分装与灭菌, 酵母菌的分离与纯化, 酵母的扩大培养, 菌种的鉴定。强化实践, 提高学生对于知识的综合应用能力。

**关键词** 微生物学实验; 天然酵母菌; 实验模块

中图分类号 S-01 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)05-01581-02

## An Experiment Module of Isolation, Enlarge Cultivation and Identification of Natural Yeast for Microbiological Experiment Teaching

LIANG Bao-dong, ZHANG Ai-min et al (Department of Life Science and Engineering, Jining University, Jining, Shandong 273155)

**Abstract** A group of related experiments, focusing on isolation, cultivation and identification of natural yeast into an experiment module, was designed and applied in microbiological experiment teaching. The experiment module included preparation and sterilization of media, isolation of the strain, enlarge cultivation conditions and identification of the strain. The teaching method can strengthen the practice ability and improve the students' ability of comprehensive application of knowledge.

**Key words** Microbiological experiment; Natural yeast; Experiment module

微生物学是生物工程专业重要的一门核心专业课程, 实验课是理论课程的重要组成部分, 具有很强的实践性和应用性<sup>[1]</sup>。现使用教材中, 往往都是独立实验, 且实验之间缺乏相应的关联性, 导致学生对实验课程没有系统的认识。尤其是新建的地方本科院校, 受先前教学方式的影响和学生知识储备的限制, 往往只是掌握一些零星分散的实验技术, 如何在具体的教学过程中提高学生有关知识技术的整合, 有针对性地解决实际生产和科研问题, 显得尤为必要。另外, 受传统教学方式的影响, 学生经常被动地去接受和模仿, 缺乏主动性和独立思考。针对这些问题, 可在学生掌握基本实验技能的基础上, 在微生物学实验课程中尝试性地开设综合性大实验, 结合学院设立的“大学生创新性学习和研究项目”, 以课题驱动构建教学内容, 提高学生综合应用和解决实际问题的能力。笔者以“天然酵母菌的筛选、培养和选育”为主线的实验模块为主, 介绍济宁学院微生物学实验课程的教改研究。该实验模块以研究型课题为标准, 设计4次实验课, 按照相互关联、前后衔接的思路, 共同组成一个研究型实验, 代替了原微生物学实验课程几个分散的、独立的实验, 使微生物学基础实验与技术实验有机地组合起来, 具体介绍如下。

### 1 第1次实验: 培养基的配制、分装与灭菌(3学时)

安排学生配制实验所需的全部培养基, 包括固体培养基、液体培养基, 并进行分装(表1), 准备培养皿、移液管等, 分别进行高压蒸汽灭菌和烘箱干热灭菌。由于配制培养基种类较多, 可两个同学为一组, 分工配制不同的培养基, 然后进行交流。这次实验课的安排与以往不同的是, 将单纯的培

养基配制和灭菌技术安排为一系列实验, 这样就大大提高了实验的针对性和目的性, 丰富了培养基的配制种类, 使同学们更深刻地认识到培养基在微生物实验中的重要性, 实验的积极性和主动性大大增强。如酵母菌富集培养基含有较高的葡萄糖和较酸的环境, 以及能抑制多种杂菌(许多细菌、放线菌和快速生长的霉菌)的孟加拉红, 故十分有利于酵母菌的增殖, 加强了对微生物培养的认知。

表1 培养基的配方、分装和灭菌要求

培养基	配方	分装	灭菌
菌种富集培养基 <sup>[2]</sup>	葡萄糖 50 g, 尿素 1 g, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 1 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2.5 g, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5 g, MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 1 g, FeSO <sub>4</sub> · 7HO <sub>2</sub> 0.1 g, 酵母膏 0.5 g, 孟加拉红 0.03 g, pH4.5	摇瓶/平板	110 ℃, 20 min
麦芽汁培养基 <sup>[3]</sup>	从啤酒厂购买麦芽汁原液, 稀释到合适的5~6°Bx, pH6.4	试管/摇瓶	110 ℃, 20 min
麦芽汁固体培养基 <sup>[3]</sup>	从啤酒厂购买麦芽汁原液, 稀释到合适的5~6°Bx, 再加入2%的琼脂作为凝固剂, pH6.4	试管斜面/平板	110 ℃, 20 min

### 2 第2次实验: 酵母菌的分离与纯化(3学时)

学生于课前到校园附近葡萄糖园采集土壤样本, 不同组学生分别选择葡萄糖园表土(铲去2~3 cm的表土, 再采集土样)、有落果的表土、葡萄糖烂果、新鲜的葡萄糖粒、结果处的葡萄糖梗, 带回实验室, 投入装有20 ml 酵母菌富集培养液的三角瓶中, 置于28 ℃恒温摇床震荡培养2~3 d。用平板划线法、涂布平板法或倾注平板法分离单菌落。若菌株不纯, 可对菌落进行多次划线分离, 以获得纯菌落。将上述纯种接种至麦芽汁试管斜面上, 经28 ℃培养1~2 d后, 在显微镜下观察其形态, 结合菌落形态, 判断是否为目的菌株。将得到的菌落纯的菌种贴上标签, 放4 ℃下保存, 备用<sup>[2]</sup>。该实验将以往的单纯土壤微生物的分离纯化实验进行了具体化, 变为酵母菌的分离纯化, 稀释浇注平板、稀释涂布平板和平板划线分离、斜面菌种转接、液体培养等实验技术全部安

**基金项目** 山东省高等学校教学改革项目(2012505); 济宁学院教学改革项目(2011jx05)。

**作者简介** 梁宝东(1979-), 男, 山东定陶人, 讲师, 硕士, 从事微生物发酵与生物活性物质研究。\*通讯作者, 教授, 从事遗传学研究。

**收稿日期** 2014-01-11

排在这个实验中,使同学们不但掌握了具体的实验技术,还了解到如何应用这些技术从自然界分离获得所需要的目的菌株。

**3 第3次实验:酵母菌的扩大培养(6学时)** 安排学生先利用摇床进行培养,100 ml三角瓶,12°Bx麦芽汁培养基,装液量20 ml,接新活化的斜面菌种1~2环,30℃静置培养24~36 h。细胞浓度达 $8.0 \times 10^8$ 个/ml以上,无杂菌,无死细胞,作为一级种子;500 ml三角瓶,培养基同上,装液量80 ml,每瓶接种一级种子液约8 ml,30℃培养12~16 h,细胞浓度达 $1.5 \times 10^9$ 个/ml以上,无杂菌,无死细胞,为二级种子。将二级种子接种于5L-全自动发酵罐,装液量为4 L 12°Bx麦芽汁培养基,30℃培养<sup>[3]</sup>。在培养的过程中,每2 h取样,检测发酵液中的还原糖含量、pH和酵母菌的细胞数,测量方法分别为3,5二硝基水杨酸法、数字pH计和血球计数板法。根据测量的数据,以培养时间为横坐标,检测参数为纵坐标,分别绘制降糖曲线、pH曲线和生长曲线,根据这些曲线判断酵母菌生长的规律。这样的安排将原来单一、枯燥的实验转变为综合性的扩大培养发酵实验,同时还让同学们掌握了摇瓶液体培养、5L-全自动发酵罐的使用和培养、生长曲线的测定和发酵相关参数的测定等,紧密围绕专业开设实验。

#### 4 第4次实验:酵母菌的鉴定(3学时)

**形态学特征:**分别将待鉴定菌种接种于麦芽汁液体培养基和固体培养基,28℃培养3 d观察,记录细胞形态学和培养特征。用测微尺在显微镜下测定鉴定菌株个体的大小。将鉴定菌株接种于M cclary培养基上,28℃培养3 d,涂片在显微镜下观察子囊孢子的形成。

**生理生化特征:**分别进行糖发酵实验、碳源和氮源同化实验、产类淀粉化合物和产酯测定实验、牛奶冻化、无维生素培养基生长实验、需维生素测定、耐渗透压、尿素分解、明胶液化实验、培养温度实验等。

菌种的培养过程尽可能都安排在课余时间,课堂上侧重特征鉴定。鉴于此部分实验多,依据前期菌种分离过程记录的菌种特征,选择较为典型的菌种进行鉴定,同时将2~3小

组同学合并成1组,分别做相应的实验,减少工作量,又完成鉴定工作。根据记录鉴定菌株的形态学特征和生理生化特征,对照参考文献<sup>[4]</sup>,确定菌株的门、纲、目、科、属、种。

整个实验过程要求学生客观、真实记录。实验结束后,学生写出一份完整的实验报告,要求实验报告按照研究型论文的写作方式进行。随后,每组同学分别将试验内容做成PPT格式,择优进行课堂讲解(选择1名学生)和讨论,分析实验中出现的各种问题,并对结果进行必要的归纳总结和理论探讨,并将此部分内容进行整理归纳,附实验报告后再统一上交<sup>[5]</sup>。

要开展好这类综合型、研究型的实验教学,总结出以下几个问题:①学生需要利用较多的课外时间,就要求合理进行实验计划和时间分配,避免实验与其他课程相冲突;②实验空间的限制性,若多组同时进行,需占用较大实验室空间和设备,要合理进行调节;③每组实验周期较长,学生欠缺研究经验,需要教师花费较多精力和时间,大大增加了工作量;④筛选菌种的偶然性可能会使部分组同学的实验出现负结果,需进行组间人员调配或共享菌株进行后续分实验;⑤实验过程中,学生要及时总结问题,分析原因,组间交流经验,团队合作。在实验结束后的讨论过程中,同学反映真实体会到了科研工作的艰辛,认识到细致观察、耐心的重要性。此类实验开设方式得到大家的认可,增强了实验的整体性、系统性和学生独立自主研究的能力,增加了发散性思维,使学生初步学会研究型论文的写作方法,并将学到的理论知识更好地应用于解决问题上,很好地锻炼了实践能力,不但为后续的毕业课题或研究工作打下坚实的基础,还增强了学生在就业市场中的竞争力。

#### 参考文献

- [1] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京:高等教育出版社,2011.
  - [2] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 北京:高等教育出版社,2010.
  - [3] 贾士儒. 生物工程专业实验[M]. 北京:中国轻工业出版社,2010.
  - [4] 巴尼特 A, 佩恩 R W, 亚罗 D. 酵母菌的特征与鉴定手册[K]. 胡瑞卿, 译. 青岛:青岛海洋出版社,1991:100-175.
  - [5] 毛露甜, 王绍芬. 微生物学实验教学中开展设计性实验的做法与体会[J]. 微生物学通报,2007,34(3):614-616.
- (上接第1580页)
- [11] 何圣静, 赵惠英. 什么是实验能力[J]. 教学仪器与实验,1992,8(2):39-41.
  - [12] 欧胜彬, 陈军. 应用型本科院校专业实习的探索与实践[J]. 实验室研究与探索,2011,30(10):161-165.
  - [13] 舒媛. 高校大学生参与实习的国内研究评述[J]. 出国与就业(就业版),2012(2):35,37.
  - [14] 张丽莉, 郑元梅. 专业实验与实习相结合的实践教学模式探索[J]. 黄石理工学院学报,2009,25(4):60-62.
  - [15] 李清. 大学实验教学改革与情商教育[J]. 实验技术与管理,2013,30(1):8-10,14.
  - [16] 肖建富, 高瞻, 李桂新. 综合性实验的界定与作用探析[J]. 实验技术与管理,2008,25(12):143-145,165.
  - [17] 刘琴. 开放式实验教学研究现状及展望[J]. 实验科学与技术,2010,8(4):81-82.
  - [18] 倪昶. 基于网络的虚拟实验系统的开发与应用[D]. 金华:浙江师范大学,2009:1-72.
  - [19] 富力, 文连奎, 赵树春, 等. 改革植物资源学实验课的探索[J]. 高等农业教育,1992(5):35-36.
  - [20] 淮虎银, 哈斯巴根. 植物资源学实验课程的改革与实验项目的设计[J]. 内蒙古师范大学学报:教育科学版,2012,25(9):145-147.
  - [21] 陈全斌. 将科学研究引入植物资源学课堂教学的探索[J]. 广西教育,2011(9):90.
  - [22] 耿世磊. 以应用能力培养为目的的植物资源学教学改革[J]. 教育教学论坛,2012(23):174-175.
  - [23] 农学院(农业科学院). 《植物资源学》课程实验教学大纲[EB/OL]. (2005-11-23)http://nxy.nwsuaf.edu.cn/show.php?articleid=580.