

揭阳职业技术学院
生物工程系

授 课 教 案

2025— 2026 学年度第二学期

课程名称 食品微生物学

班 级 食品检验检测技术 251 、 251 (3+)

教 研 室 食品教研室

授课教师 林潇红

实验一 微生物实验基本知识和安全教育

授课章节	实验一 微生物实验基本知识和安全教育		
课时安排	3	教学方法	实践法
教学主要内容： 微生物实验室基本布局与功能分区认知 实验室安全规范与无菌操作核心要求 常见实验器材、试剂的分类与安全使用 意外事故应急处理流程 实验废弃物分类处理与实验室清洁规范			
教学目的、要求： <p>(一) 知识目标</p> 了解微生物实验室的基本结构与安全防护要求 掌握无菌操作、试剂管理、废弃物处理的核心知识 熟悉常见实验事故的应急处理方法 <p>(二) 能力目标</p> 能规范识别实验室安全标识与危险警示 能正确执行洗手、消毒、穿戴防护用品等基础操作 能独立完成实验台面清洁与废弃物分类投放 <p>(三) 素养目标</p> 养成“安全第一、规范操作”的实验意识 培养严谨细致、爱护环境的科学素养 树立对实验结果与自身安全负责的责任意识 <p>(四) 课程思政</p> 敬畏实验规则，严谨对待每一项操作细节。			
教学重点、难点： <p>(一) 教学重点</p> 微生物实验室核心安全规范与无菌操作要求 常见实验器材、试剂的安全使用与应急处理流程 <p>(二) 教学难点</p>			

始终保持无菌与安全意识，将规范内化为操作习惯
准确判断并处理突发实验安全事故

教学过程：

实训原理

微生物实验的核心是“无菌、安全、规范”，实验室规范是避免杂菌污染、保障实验成功的前提；常用仪器的正确使用是实验顺利开展的基础，也是保护自身安全、避免实验失误的关键。

实训材料与器材

（一）材料

无菌生理盐水、无菌棉签、酒精棉片

（二）器材

酒精灯、高压蒸汽灭菌锅、1mL 移液管、接种环、无菌培养皿、试管、试管架、酒精喷壶、手套、口罩

实训步骤

模块一：实验室使用规范

1. 进入实验室前，需洗手、佩戴好手套、口罩，不得穿拖鞋、短裤，避免污染实验环境。
2. 实验前检查实验室通风、消毒情况，确认无菌操作台清洁，所有仪器、耗材摆放整齐并做好标记。
3. 实验过程中，不得喧哗、打闹，不得随意触碰与本次实验无关的仪器、试剂，严禁将食物、水杯带入实验室。
4. 实验产生的废液、废菌液，需倒入指定容器，不得随意倾倒；实验结束后，及时清理台面，将仪器归位、消毒。
5. 离开实验室前，关闭电源、水源、酒精灯，确认无安全隐患后再离开。

模块二：常用仪器设备使用方法

1. 酒精灯：点燃时用火柴（禁止用打火机），熄灭时用灯帽盖灭，严禁用嘴吹灭；加热时用外焰，避免烫伤。
2. 移液管：使用前灼烧灭菌，吸取液体时缓慢操作，避免液体洒出；使用后及时清洗、灭菌、归位。

3. 接种环：使用前灼烧至通红（灭菌），冷却后再接触菌液或培养基；使用后再灼烧，避免杂菌残留。
4. 高压蒸汽灭菌锅：加入适量蒸馏水，放入待灭菌仪器，盖紧锅盖，设定参数（121℃、101kPa、20 分钟），灭菌结束后，待压力降至 0 再开盖。

模块三：实操演练与注意

1. 每人依次操作酒精灯的点燃与熄灭、移液管吸液，老师现场指导，纠正不规范动作。
2. 分组进行仪器灭菌、归位实操，确保每个人都能熟练掌握核心操作。
3. 演练结束后，分组检查实验台面清洁、仪器归位情况，培养良好实验习惯。

九、注意事项

- 所有仪器使用前必须灭菌，操作过程中全程保持无菌意识，避免杂菌污染。
- 加热、灭菌操作时，佩戴手套，避免烫伤；高压蒸汽灭菌锅开盖前，务必确认压力为 0。
- 实验过程中，若不慎打翻试剂、菌液，立即用酒精棉片擦拭消毒，避免污染。
- 实验结束后，及时清理台面、归位仪器，养成整洁、规范的实验习惯。

作业布置：

1. 记录实验室使用的 3 条核心规范；
2. 简要描述 2 种核心仪器的使用步骤；
3. 写出 1-2 条操作过程中需要注意的安全隐患及规避方法。

实验二 玻璃器皿的洗涤、包扎与灭菌

授课章节	实验二 玻璃器皿的洗涤、包扎与灭菌		
课时安排	3	教学方法	实践法
教学主要内容： 1、各种常用玻璃器皿的名称和规格 2、玻璃器皿等器材的清洗、包扎技术			
教学目的、要求： 一、知识目标 1. 熟悉实验所需各种常用玻璃器皿的名称和规格 2. 掌握玻璃器皿等器材的清洗、包扎技术 二、技能目标 能对玻璃器皿等器材进行清洗、包扎 三、素养目标 1. 通过创设情景、问题、激发学生的好奇心和求知欲。 2. 通过项目教学、小组交流，培养学生互助合作的团队精神。 课程思政： 尊重科学事实、勇于探索真理的精神。			
教学重点、难点： 教学重点：玻璃器皿等器材的清洗、包扎技术 教学难点：玻璃器皿等器材的包扎技术			
教学过程： (一) 玻璃器皿的清洗： 新购的玻璃器皿的洗涤 将器皿放入 2 % 盐酸溶液中浸泡数小时，以除去游离的碱性物质，最后用流水冲净。 对容量较大的器皿，如大烧瓶、量筒等，洗净后注入浓盐酸少许，转动容器使其内部表面均沾有盐酸，数分钟后倾去盐酸，再以流水冲净，倒置于洗涤架上晾干，即可使用。 常用旧玻璃器皿的洗涤 确实无病原菌或未被带菌物污染的器皿，使用前后，可按常规用洗衣粉水进行刷			

洗：

吸取过化学试剂的吸管，先浸泡于清水中，待到一定数量后再集中进行清洗。

带菌玻璃器皿的洗涤

凡实验室用过的菌种以及带有活菌的各种玻璃器皿，必须经过高温灭菌或消毒后才能进行刷洗：

1. 带菌培养皿、试管、三角瓶等物品，做完实验后放入消毒桶内，用 0.1MPa 灭菌 20~30 min 后再刷洗。含菌培养皿的灭菌，底盖要分开放入不同的桶中，再进行高压灭菌。

2. 带菌的吸管、滴管，使用后不得放在桌子上，立即分别放入盛有 3~5% 来苏尔或 5% 石炭酸或 0.25% 新洁尔灭溶液的玻璃缸（筒）内消毒 24h 后，再经 0.1MPa 灭菌 20 min 后，取出冲洗。

3. 带菌载玻片及盖玻片，使用后不得放在桌子上，立即分别放入盛有 3~5% 来苏尔或 5% 石炭酸或 0.25% 新洁尔灭溶液的玻璃缸（筒）内消毒 24h 后，用夹子取出经清水冲干净。

新购置的载片，先用 2% 盐酸浸泡数小时，冲去盐酸。再放浓洗液中浸泡过液，用自来水冲净洗液，浸泡在蒸馏水中或擦干装盒备用。

如用于细菌染色的载玻片，要放入 50g/L 肥皂水中煮沸 10min，然后用肥皂水洗，再用清水洗干净。

最后将载玻片浸入 95% 酒精中片刻，取出用软布擦干，或晾干，保存备用。

若用皂液不能洗净的器皿，可用洗液浸泡适当时间后再用清水洗净。

4. 含油脂带菌器材的清洗

单独高压灭菌：用 0.1MPa 灭菌 20~30 min → 趁热倒去污物 → 倒放在铺有吸水纸的篮子上 → 用 100 °C 烘烤 0.5h → 用 5% 的碳酸氢钠水煮两次 → 再用肥皂水刷洗干净。

（二）玻璃器材的晾干或烘干

不急用的玻璃器材：可放在实验室中自然晾干；

急用的玻璃器材：把器材放在托盘中（大件的器材可直接放入烘箱中），再放入烘箱内，用 80~120°C 烘干，当温度下降到 60°C 以下再打开取出器材使用。

（三）器皿的包扎：

要灭菌后的器皿仍保持无菌状态，需在灭菌前进行包扎。

1. 培养皿：洗净的培养皿烘干后每 10 套（或根据需要而定）叠在一起，用牢固的纸卷成一筒，或装入特制的铁桶中，然后进行灭菌。

2. 吸管：洗净、烘干后的吸管，在吸口的一头塞入少许脱脂棉花，以防在使用时造成污染。塞入的棉花量要适宜，多余的棉花可用酒精灯火焰烧掉。每支吸管用一条宽约 4~5cm 的纸条，以 30~50℃ 的角度螺旋形卷起来，吸管的尖端在头部，另一端用剩余的纸条打成一结，以防散开，标上容量，若干支吸管包扎成一束进行灭菌。使用时，从吸管中间拧断纸条，抽出试管。

3. 试管和三角瓶：试管和三角瓶都需要做合适的棉塞，棉塞可起过滤作用，避免空气中的微生物进入容器。制作棉塞时，要求棉花紧贴玻璃壁，没有皱纹和缝隙，松紧适宜。过紧易挤破管口和不易塞入；过松易掉落和污染。棉塞的长度不小于管口直径的 2 倍，约 2/3 塞进管口。

目前，国内已开始采用塑料试管塞，可根据所用的试管的规格和试验要求来选择和采用合适的塑料试管塞。

若干支试管用绳扎在一起，在棉花部分外包裹油纸或牛皮纸，再用绳扎紧。三角瓶加棉塞后单个用油纸包扎。

作业布置：

1. 实验有哪些注意事项？

实验三 培养基的配制及灭菌技术

授课章节	实验三 培养基的配制及灭菌技术		
课时安排	3	教学方法	实践法
<p>教学主要内容：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1、常用细菌培养基的配制方法 2、高压蒸汽灭菌的操作方法 			
<p>教学目的、要求：</p> <p>一、知识目标</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 掌握常用细菌培养基的配制方法。 2. 掌握高压蒸汽灭菌的操作方法。 <p>二、能力目标</p> <ol style="list-style-type: none"> 1、能配制培养基 2、能进行灭菌操作 <p>三、素养目标</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 通过创设情景、问题、激发学生的好奇心和求知欲。 2. 通过项目教学、小组交流，培养学生互助合作的团队精神。 <p>课程思政： 尊重科学事实、勇于探索真理的精神。</p>			
<p>教学重点、难点：</p> <p>教学重点：常用细菌培养基的配制方法</p> <p>教学难点：高压蒸汽灭菌的操作方法</p>			
<p>教学过程：</p> <p>（一）玻璃器皿的洗涤</p> <p>玻璃器皿在使用前必须洗刷干净。将三角瓶、试管、培养皿、量筒等浸入含有洗涤剂的水中。用毛刷刷洗，然后用自来水及蒸馏水冲净。移液管先用含有洗涤剂的水浸泡，再用自来水及蒸馏水冲洗。洗刷干净的玻璃器皿置于烘箱中烘干后备用。</p> <p>（二）液体及固体培养基的配制过程</p> <ol style="list-style-type: none"> 1、液体培养基配制 <p>（1）称量：一般可用 0.01g 天平称量配制培养基所需的各种药品，先按培养基</p>			

配方计算出各成分的用量。然后进行准确称量。

(2) 溶解：将称好的药品置于一烧杯中，先加入少量水（根据实验需要可用自来水或蒸馏水），用玻璃棒搅动，加热溶解。

(3) 定容：待全部药品溶解后，倒入一量筒中，加水至所需体积。如某种药品用量太少时，可预先配成较浓溶液，然后按比例吸取一定体积溶液，加入至培养基中。

(4) 调 pH：一般用 pH 试纸测定培养基的 pH。用剪刀剪出一小段 pH 试纸，然后用镊子夹取此段 pH 试纸，在培养基中蘸一下，观看其 pH 范围，如培养基偏酸或偏碱时，可用 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 溶液进行调节。调节 pH 时，应逐滴加入 NaOH 或 HCl 溶液，防止局部过酸或过碱，破坏培养基中成分。边加边搅拌，并不时用 PH 试纸测试，直至达到所需 pH 为止。

(5) 过滤：用滤纸或多层纱布过滤培养基。一般无特殊要求时，此步可省去。

2、固体培养基的配制

配制固体培养基时，应将已配好的液体培养基加热煮沸，再将称好的琼脂（1.5~2%）加入，并用玻棒不断搅拌，以免糊底烧焦。继续加热至琼脂全部融化，最后补足因蒸发而失去水分。

(三) 培养基的分装

将已配好培养基分装入三角瓶内，分装时注意不要使培养基沾污管口或瓶口，造成污染。如操作不小心，培养基沾污管口或瓶口时，可用镊子夹一小块脱脂棉，擦去管口或瓶口的培养基，并将脱脂棉弃去。

用于振荡培养微生物时，可在 250 ml 三角瓶中加入 50 ml 的液体培养基；若用于制作平板培养基用时，可在 250 ml 三角瓶中加入 150ml 培养基，然后再加入 3g 琼脂粉（按 2% 计算），灭菌时瓶中琼脂粉同时被融化。

(四) 棉塞的制作及三角瓶的包扎

为了培养好气性微生物，需提供优良通气条件，同时为防止杂菌污染，则必须对通入试管或三角瓶内空气预先进行过滤除菌。通常方法是在三角瓶口加上棉花塞等。

三角瓶棉塞制作

通常在棉塞外包上一层纱布，再塞在瓶口上。有时为了进行液体振荡培养加大通

气量，则可用 8 层纱布代替棉塞包在瓶口上，目前也有采用硅胶塞直接盖在瓶口上。

在装好培养基并塞好棉塞或包扎八层纱布或盖好硅胶塞的三角瓶口上，再包上一层牛皮纸并用线绳捆好，灭菌待用。

（五）培养基的灭菌

培养基经分装包扎后，应立即按配制方法规定的灭菌条件进行进行高压蒸汽灭菌。

（六）培养基的灭菌检查

灭菌后的培养基，一般需进行无菌检查。最好取出 1-2 管(瓶)，置于 37℃温箱中培养 1-2 天，确定无菌后方可使用。

五、注意事项及其它说明

1、加水：首先将内层锅取出，再向外层锅内加入适量的水，使水面没过加热蛇管，与三角搁架相平为宜。切勿忘记检查水位，加水量过少，灭菌锅会发生烧干引起炸裂事故。

2、装料：放回内层锅，并装入待灭菌的物品。注意不要装得太挤，以免妨碍蒸汽流通而影响灭菌效果。装有培养基的容器放置时要防止液体溢出，三角瓶与试管口端均不要与桶壁接触，以免冷凝水淋湿包扎的纸而透入棉塞。

3、加盖：将盖上与排气孔相连的排气软管插入内层锅的排气槽内，摆正锅盖，对齐螺口，然后以对称方式同时旋紧相对的两个螺栓，使螺栓松紧一致，勿使漏气，并打开排气阀。

4、排气：打开电源加热灭菌锅，将水煮沸，使锅内的冷空气和水蒸汽一起从排气孔中排出。一般认为当排出的气流很强并有嘘声时，表明锅内的空气已排尽，沸腾后约需 5 分钟。

5、升压：冷空气完全排尽后，关闭排气阀，继续加热，锅内压力开始上升。

6、保压：当压力表指针达到所需压力时，控制电源，开始计时并维持压力至所需的时间。如本实验中采用 0.1Mpa，121.5℃，20 分钟灭菌。灭菌的主要因素是温度而不是压力，因此锅内的冷空气必须完全排尽后，才能关闭排气阀，维持所需压力。

7、降压：达到灭菌所需的时间后，切断电源，让灭菌锅温度自然下降，当压力

表的压力降至“0”后，方可打开排气阀，排尽余下的蒸汽，旋松螺栓，打开锅盖，取出灭菌物品，倒掉锅内剩水。压力一定要降到“0”后，才能打开排气阀，开盖取物。否则就会因锅内压力突然下降，使容器内的培养基或试剂由于内外压力不平衡而冲出容器口，造成瓶口被污染，甚至灼伤操作者。

8、无菌检查：将已灭菌的培养基放入 37℃恒温培养箱培养 24h，检查无杂菌生长后，即可使用。三角瓶加棉塞后单个用油纸包扎。

作业布置：

- 1、为什么微生物实验室所用的三角瓶口要塞上棉塞才能使用？
- 2、配制培养基时为什么要调节 pH？
- 3、高压蒸汽灭菌为什么比干热灭菌要求温度低、时间短？

实验四 微生物分离纯化技术

授课章节	实训四 微生物分离纯化技术		
课时安排	3	教学方法	实践法
<p>教学主要内容：</p> <p style="padding-left: 20px;">斜面、平板固体培养基的配制；</p> <p style="padding-left: 20px;">斜面接种操作；</p> <p style="padding-left: 20px;">平板划线、涂布分离接种操作。</p>			
<p>教学目的、要求：</p> <p style="padding-left: 20px;">（一）知识目标</p> <p style="padding-left: 40px;">掌握斜面、平板培养基的配方及简易配制、灭菌原理；</p> <p style="padding-left: 40px;">了解接种、分离的核心原理及无菌操作要求。</p> <p style="padding-left: 20px;">（二）能力目标</p> <p style="padding-left: 40px;">能独立完成斜面、平板培养基的配制操作；</p> <p style="padding-left: 40px;">能规范完成斜面接种、平板划线与涂布接种。</p> <p style="padding-left: 20px;">（三）素养目标</p> <p style="padding-left: 40px;">养成严谨的实验态度，严格遵循无菌操作规范；</p> <p style="padding-left: 40px;">培养动手实操与问题排查能力，树立安全实验理念；</p> <p style="padding-left: 40px;">培养团队协作意识，规范完成实验操作与台面整理。</p> <p>三、课程思政（简短贴合，不生硬）</p> <p style="padding-left: 20px;">培养严谨求实的科学素养，规范操作每一步，敬畏实验、尊重科学。</p>			
<p>教学重点、难点：</p> <p style="padding-left: 20px;">（一）教学重点</p> <p style="padding-left: 40px;">斜面、平板培养基的简易配制与灭菌操作；</p> <p style="padding-left: 40px;">斜面接种、平板划线及涂布接种规范操作。</p> <p style="padding-left: 20px;">（二）教学难点</p> <p style="padding-left: 40px;">全程保持无菌意识，避免液体菌液及培养基杂菌污染；</p> <p style="padding-left: 40px;">掌握平板划线、涂布技巧；</p> <p style="padding-left: 40px;">培养基配制中琼脂溶解、倒平板/摆斜面的规范操作。</p>			
<p>教学过程：</p>			

实训原理

斜面培养基倾斜凝固后增大营养表面积，适配菌液接种后微生物增殖保存；平板培养基平整表面可将稀释后的菌液，通过划线、涂布分离出单个菌落，实现微生物纯化。无菌操作是实验成功的核心，可避免杂菌污染。

实训材料与器材

（一）材料

牛肉膏、蛋白胨、NaCl、琼脂、蒸馏水、无菌生理盐水（0.85%）、大肠杆菌液体菌液、无菌水。

（二）器材

试管、无菌培养皿、烧杯、玻璃棒、酒精灯、接种环、1mL 移液管、高压蒸汽灭菌锅、恒温培养箱、天平、pH 试纸（6.8-7.0）、试管架、记号笔、无菌操作台、手套、口罩。

实训步骤

模块一：斜面、平板培养基配制与灭菌

1. 称量溶解：按配方（牛肉膏 3g、蛋白胨 10g、NaCl 5g、琼脂 18g、蒸馏水 1000mL），称量后加入烧杯，加蒸馏水搅拌，小火加热至琼脂完全溶解，冷却至 50℃左右调节 pH 至 6.8-7.0。

2. 分装

（1）取一个玻璃漏斗，装在铁架上，漏斗下连一根橡皮管，橡皮管下端再与另一玻璃管相接，橡皮管的中部加一弹簧夹。分装时，用左手拿住空试管中部，并将漏斗下的玻璃管嘴插入试管内，以右手拇指及食指开放弹簧夹，中指及无名指夹住玻璃管嘴，使培养基直接流入试管内。装入试管培养基的量视试管大小及需要而定，若所用试管大小为 15×150 mm 时，液体培养基可分装至试管高度 1 / 4 左右为宜；如分装固体或半固体培养基时，在琼脂完全融化后，应趁热分装于试管中。用于制作斜面的固体培养基的分装量为管高 1 / 5（约 3—4mL），半固体培养基分装量为管高的 1 / 3 为宜。

（2）试管棉塞的制作

制棉塞时，应选用大小、厚薄适中的普通棉花一块，铺展于左手拇指和食指扣成的团孔上，用右手食指将棉花从中央压入团孔中制成棉塞。然后直接压入试

管或三角瓶口。也可借用玻璃棒塞入，也可用折叠卷塞法制作棉塞。

制作的棉塞应紧贴管壁，不留缝隙，以防外界微生物沿缝隙侵入，棉塞不宜过紧或过松，塞好后以手提棉塞，试管不下落为准。棉塞的 2 / 3 在试管内，1 / 3 在试管外。目前也有采用硅胶塞代替棉塞直接盖在试管口上。

将装好培养基并塞好棉塞或硅胶塞的试管捆成一捆，外面包上一层牛皮纸。用记号笔注明培养基的名称及配制日期。

(3) 培养基的灭菌

试管分装 1/4-1/3 体积，三角烧瓶装适量用于倒平板，加棉塞、包扎，121℃、101kPa 灭菌 20 分钟；同步灭菌无菌培养皿，灭菌后取出冷却。

(4) 斜面和平板的制作

1、斜面的制作

将已灭菌装有琼脂培养基的试管，趁热置于木棒或玻棒上，使成适当斜度，凝固后即成斜面。斜面长度不超过试管长度 1 / 2 为宜。如制作半固体或固体深层培养基时，灭菌后则应垂直放置至凝固。

2、平板的制作

将装在三角瓶或试管中已灭菌的琼脂培养基融化后，待冷至 50℃左右倾入无菌培养皿中。温度过高时，皿盖上的冷凝水太多；温度低于 50℃，培养基易于凝固而无法制作平板。

平板的制作应在火旁进行，左手拿培养皿，右手拿三角瓶的底部或试管，左手同时用小指和手掌将棉塞打开，灼烧瓶口，用左手大拇指将培养皿盖打开一缝，至瓶口正好伸入，倾入 10~15mL 培养基，迅速盖好皿盖，置于桌上，轻轻旋转平皿，使培养基均匀分布于整个平皿中，冷凝后即成平板。

3. 凝固备用：试管倾斜 45°摆斜面，自然凝固；三角烧瓶中培养基冷却至 45-50℃，在无菌操作台倒平板（每皿 15-20mL），凝固后做好标记。

模块二：斜面接种

1. 无菌准备：点燃酒精灯，接种环灼烧灭菌；佩戴手套，将液体菌液、斜面培养基放入无菌区。
2. 取菌接种：灼烧液体菌液试管口，用接种环蘸取少量菌液，再次灼烧试管口；灼烧斜面培养基试管口，将接种环伸入试管，沿斜面轻轻划线，灼烧

接种环和试管口后塞回棉塞。

3. 培养：做好标记，将斜面试管放入 37°C 恒温培养箱，培养 18-24 小时。

模块三：平板分离接种

1. 菌液稀释：取 1mL 液体菌液，加入 9mL 无菌水，振荡混匀，制成稀释菌液。
2. 划线接种：接种环灼烧灭菌，蘸取少量稀释菌液，在平板表面连续划线(3-4 组)，灼烧接种环，做好标记。
3. 涂布接种：用移液管吸取 0.1mL 稀释菌液，滴在另一平板中央，用无菌涂布器（灼烧冷却）均匀涂布，做好标记。
4. 培养：将平板放入 37°C 恒温培养箱，培养 18-24 小时。

模块四：观察记录

1. 斜面观察：记录菌苔颜色、质地，判断是否污染；
2. 平板观察：记录划线、涂布平板上单个菌落的形态、颜色，判断分离效果。

注意事项

琼脂溶解小火加热、不断搅拌，防止糊底；倒平板、摆斜面温度控制在 45-50°C，避免烫伤。

全程无菌操作：接种环、试管口、移液管需灼烧灭菌，液体菌液不得接触无菌区外物品。

液体菌液蘸取、吸取适量，划线、涂布力度轻柔，避免划破培养基；稀释菌液振荡均匀。

实验结束后，及时清理台面、归位仪器，规范处理废菌液、废耗材。

作业布置：

1. 记录培养基配方、配制及灭菌关键参数；
2. 简要描述液体菌液接种、分离的操作流程。

实验五：普通光学显微镜的使用

授课章节	实验五 普通光学显微镜的使用		
课时安排	3	教学方法	实践法
<p>教学主要内容：</p> <p style="margin-left: 20px;">1、显微镜的使用</p> <p style="margin-left: 20px;">2、微生物的形态观察</p>			
<p>教学目的、要求：</p> <p style="margin-left: 20px;">一、知识目标</p> <p style="margin-left: 40px;">1、掌握显微镜的使用方法。</p> <p style="margin-left: 20px;">二、技能目标</p> <p style="margin-left: 40px;">1、能使用显微镜</p> <p style="margin-left: 20px;">三、素养目标</p> <p style="margin-left: 40px;">1. 通过创设情景、问题、激发学生的好奇心和求知欲。</p> <p style="margin-left: 40px;">2. 通过项目教学、小组交流，培养学生互助合作的团队精神。</p> <p>课程思政： 尊重科学事实、勇于探索真理的精神。</p>			
<p>教学重点、难点：</p> <p style="margin-left: 20px;">教学重点：显微镜的使用。</p> <p style="margin-left: 20px;">教学难点：油镜的使用。</p>			
<p>教学过程：</p> <p style="margin-left: 20px;">（一）观察前的准备</p> <p style="margin-left: 40px;">1、将显微镜置于平稳的实验台上，镜座距实验台边沿约 4cm。坐正后用左眼观察。</p> <p style="margin-left: 40px;">2、调节光源：将低倍物镜转到工作位置，把光圈完全打开，聚光器升至与载物台相距约 1mm 左右。转动反光镜采集光源，光线较强的天然光源宜用平面镜，光线较弱的天然光源或人工光源宜用凹面镜，对光至视野内均匀明亮为止。观察染色装片时，光线宜强；观察未染色装片时，光线不宜太强。</p> <p style="margin-left: 20px;">（二）低倍镜观察染色装片</p> <p style="margin-left: 40px;">首先上升镜筒，将染色装片置于载物台上，用标本夹夹住，将观察位置移至物镜正下方，物镜降至距装片 0.5cm 处，适当缩小光圈然后两眼从目镜观察，转</p>			

动粗调节器使物镜逐渐上升(或使镜台下降)至发现物像时,改用细调节器调节到物像清楚为止。移动装片,把合适的观察部位移至视野中心。

(三) 高倍镜观察

眼睛离开目镜从侧面观察,旋转转换器,将高倍镜转至正下方,注意避免镜头与玻片相碰。再由目镜观察,仔细调节光圈,使光线的明亮度适宜。用细调节器校正焦距使物镜清晰为止。将最适宜观察部位移至视野中心。不要移动装片位置,准备用油镜观察。

(四) 油镜观察

- 1、提起镜筒约 2cm,将油镜转至正下方。在玻片标本的镜检部位(镜头的正下方)滴一滴香柏油。
- 2、从侧面注视,小心慢慢降下镜筒,使油镜浸在油中至油圈不扩大为止,镜头几乎与装片接触,但不可压及装片,以免压碎玻片,损坏镜头。
- 3、将光线调亮,左眼从目镜观察,用粗调节器将镜筒徐徐上升(切忌反方向旋转),当视野中有物像出现时,再用细调节器校正焦距。如因镜头下降未到位或镜头上升太快未找到物像,必须再从侧面观察,将油镜降下,重复操作直至物像看清为止。

(五) 镜检完毕后的工作

- 1、移开物镜镜头。
- 2、取出装片。
- 3、清洁油镜,油镜使用完毕后,须用擦镜纸擦去镜头上的香柏油,再用擦镜纸沾少许二甲苯擦掉残留的香柏油,最后再用干净的擦镜纸擦干残留的二甲苯。
- 4、擦净显微镜,将各部分还原。将接物镜呈“八”字形降下,不可使其正对聚光器,同时降下聚光器,转动反光镜使其镜面垂直于镜座。最后套上镜罩,对号放入镜箱中,置阴凉干燥处存放。

作业布置:

- 1、使用油镜应特别注意哪些问题?为什么必须用香柏油?
- 2、镜检标本时,为什么先用低倍镜观察,而不是直接用高倍镜或油镜观察?

实验六：微生物的形态观察

授课章节	实验六：微生物的形态观察		
课时安排	3	教学方法	实践法
教学主要内容： 1、微生物的形态观察			
教学目的、要求： 一、知识目标 1、熟练运用显微镜观察微生物形态。 二、技能目标 1、能熟练运用显微镜观察微生物形态 三、素养目标 1. 通过创设情景、问题、激发学生的好奇心和求知欲。 2. 通过项目教学、小组交流，培养学生互助合作的团队精神。 课程思政： 尊重科学事实、勇于探索真理的精神。			
教学重点、难点： 教学重点：运用显微镜观察微生物形态。 教学难点：微生物形态的绘制。			
教学过程： (一) 观察前的准备 1、将显微镜置于平稳的实验台上，镜座距实验台边沿约 4cm。坐正后用左眼观察。 2、调节光源：将低倍物镜转到工作位置，把光圈完全打开，聚光器升至与载物台相距约 1mm 左右。转动反光镜采集光源，光线较强的天然光源宜用平面镜，光线较弱的天然光源或人工光源宜用凹面镜，对光至视野内均匀明亮为止。观察染色装片时，光线宜强；观察未染色装片时，光线不宜太强。 (二) 低倍镜观察染色装片 首先上升镜筒，将枯草芽孢杆菌染色装片置于载物台上，用标本夹夹住，将观察位置移至物镜正下方，物镜降至距装片 0.5cm 处，适当缩小光圈然后两眼从目镜观察，转动粗调节器使物镜逐渐上升(或使镜台下降)至发现物像时，改用细			

调节器调节到物像清楚为止。移动装片，把合适的观察部位移至视野中心。

（三）高倍镜观察

眼睛离开目镜从侧面观察，旋转转换器，将高倍镜转至正下方，注意避免镜头与玻片相碰。再由目镜观察，仔细调节光圈，使光线的明亮度适宜。用细调节器校正焦距使物镜清晰为止。将最适宜观察部位移至视野中心，绘图。不要移动装片位置，准备用油镜观察。

（四）油镜观察

- 1、提起镜筒约 2cm，将油镜转至正下方。在玻片标本的镜检部位（镜头的正下方）滴一滴香柏油。
- 2、从侧面注视，小心慢慢降下镜筒，使油镜浸在油中至油圈不扩大为止，镜头几乎与装片接触，但不可压及装片，以免压碎玻片，损坏镜头。
- 3、将光线调亮，左眼从目镜观察，用粗调节器将镜筒徐徐上升（切忌反方向旋转），当视野中有物像出现时，再用细调节器校正焦距。如因镜头下降未到位或镜头上升太快未找到物像，必须再从侧面观察，将油镜降下，重复操作直至物像看清为止。仔细观察并绘图。
- 4、再次观察 提起镜筒，换上金黄色葡萄球菌染色装片，依次用低倍镜、高倍镜和油镜观察，绘图。重复观察时可比第一次少加香柏油。

（五）镜检完毕后的工作

- 1、移开物镜镜头。
- 2、取出装片。
- 3、清洁油镜，油镜使用完毕后，须用擦镜纸擦去镜头上的香柏油，再用擦镜纸沾少许二甲苯擦掉残留的香柏油，最后再用干净的擦镜纸擦干残留的二甲苯。
- 4、擦净显微镜，将各部分还原。将接物镜呈“八”字形降下，不可使其正对聚光器，同时降下聚光器，转动反光镜使其镜面垂直于镜座。最后套上镜罩，对号放入镜箱中，置阴凉干燥处存放。

作业布置：

- 1、使用显微镜绘图时，眼睛的位置应该如何？
- 2、转到高倍镜和油镜时，对照明度有何要求？应如何调节？

实训七 细菌涂片制作及简单染色技术

授课章节	实训七 细菌涂片制作及简单染色技术		
课时安排	3	教学方法	实践法
<p>教学主要内容：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 细菌涂片制作流程（涂片、干燥、固定）； 2. 细菌简单染色的原理与操作流程（染色、水洗、干燥）； 3. 光学显微镜（油镜）的正确调试与使用； 4. 染色后细菌形态的观察与识别。 			
<p>教学目的、要求：</p> <p>一、知识目标</p> <p>掌握细菌简单染色的原理，理解涂片制作、固定等步骤的作用。</p> <p>二、能力目标</p> <p>能独立完成细菌涂片制作、简单染色及油镜观察操作，能准确识别常见细菌的基本形态。</p> <p>三、素养目标</p> <p>养成严格的无菌操作意识，培养严谨的实验态度和规范的实验习惯。</p> <p>课程思政： 尊重科学事实、勇于探索真理的精神。</p>			
<p>教学重点、难点：</p> <p>教学重点：细菌涂片制作的规范操作，简单染色的流程把控，油镜的正确使用；</p> <p>教学难点：均匀薄涂片的制作，油镜的调试与细准焦螺旋的规范操作，无菌操作意识的落实。</p>			
<p>教学过程：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 课前准备（10 分钟）：教师检查实验器材、菌种及试剂的完整性与适用性；学生按要求分组，领取实验器材，熟悉实验台布局。 2. 导入与讲解（15 分钟）：教师以“细菌形态观察的必要性”导入实验，简要讲解实验原理、教学目的及核心操作要点，强调无菌操作和关键步骤注意事项。 3. 示范操作（15 分钟）：教师现场示范涂片制作、简单染色、油镜使用的完整流程，重点演示均匀涂布、火焰固定、油镜调试等关键步骤，纠正常见错误操 			

作。

4. 学生实操（40分钟）：学生分组进行实验操作，教师巡回指导，及时发现并解决学生操作中出现的問題（如涂片过厚、染色时间不当、油镜使用错误等）。

5. 观察与记录（10分钟）：学生通过油镜观察染色后的细菌形态，绘制图像并记录结果，教师随机抽查观察情况。

6. 总结与答疑（10分钟）：教师汇总实验过程中出现的共性问题，进行针对性讲解，解答学生疑问，梳理实验核心要点。

一、实验原理

细菌细胞微小且透明，在光学显微镜下与背景对比度低，难以直接观察。简单染色法是利用单一染料对细菌进行染色，使染料与细菌细胞结合后，增加细胞与背景的色差，从而清晰显示细菌的形态和排列特征。

常用的简单染色染料为碱性染料（如美蓝、结晶紫、番红等），因为细菌细胞多数带负电荷，碱性染料的阳离子容易与细胞表面的负电荷结合，使细菌着色。若细菌带正电荷，也可选用酸性染料（如伊红、刚果红）进行染色。本实验选用美蓝或结晶紫作为染色剂。

二、实验材料

（一）菌种

大肠杆菌（杆状菌）、金黄色葡萄球菌（球状菌）的斜面培养物。

（二）试剂

1%美蓝染色液（或0.1%结晶紫染色液）、无菌生理盐水、香柏油、95%乙醇（用于清洁镜头）。

（三）器材

光学显微镜、载玻片、盖玻片、接种环、酒精灯、火柴、镊子、擦镜纸、吸水纸、试管架、记号笔。

三、实验步骤

（一）准备工作

1. 洗净载玻片和盖玻片：用洗洁精清洗后，用自来水冲洗干净，再用蒸馏水润洗2-3次，晾干备用（载玻片需无划痕、无污渍，避免影响观察）。

2. 标记载玻片：用记号笔在载玻片的一端标注菌种名称（如“大肠杆菌”“葡

萄球菌”)。

3. 点燃酒精灯：将酒精灯置于实验台合适位置，点燃后调整火焰，使火焰内焰为加热区域（温度适中，避免高温灼伤菌种）。

（二）涂片

1. 滴加生理盐水：用接种环取 1-2 环无菌生理盐水，滴在载玻片中央。

2. 取样与涂布：用灭菌后的接种环（接种环在酒精灯外焰灼烧灭菌，待冷却后使用，避免烫死细菌）从斜面培养物上挑取少量菌苔，放入载玻片的生理盐水中。

3. 均匀分散：用接种环轻轻将菌苔在生理盐水中研磨、涂布，制成直径约 1cm 的均匀薄涂片（涂片过厚会导致染色不均、观察时细胞重叠；过薄则细胞数量少，不易找到）。

4. 接种环灭菌：涂片完成后，将接种环再次在酒精灯外焰灼烧灭菌，放回试管架。

（三）干燥

将载玻片置于酒精灯火焰上方约 10-15cm 处进行空气干燥（或自然晾干），避免直接在火焰上烘烤（高温会导致细菌细胞变形、破裂，影响形态观察）。干燥后的涂片应呈透明薄膜状。

（四）固定

待涂片完全干燥后，手持载玻片两端，将涂片面快速通过酒精灯火焰 3 次（每次约 1-2 秒，以载玻片不烫手为宜）。固定的目的是杀死细菌，使细菌细胞牢固附着在载玻片上，避免染色和水洗时脱落，同时保持细菌的原有形态。

（五）染色

将固定后的载玻片平放于实验台上，滴加适量 1%美蓝染色液（或 0.1%结晶紫染色液），使染色液完全覆盖涂片区域，染色时间为 1-2 分钟（染色时间不足则着色浅，难以观察；时间过长则颜色过深，掩盖细胞细节）。

（六）水洗

染色结束后，手持载玻片倾斜 45°，用细小的自来水水流从载玻片上端缓慢冲洗，直至流下的水无色为止（水流不宜过急、过大，避免冲掉涂片；冲洗时应让水流从无涂片的一侧流向涂片侧，减少涂片脱落）。

（七）干燥

用吸水纸轻轻吸去载玻片上的水分（注意不要摩擦涂片，以免破坏细胞），然后将载玻片置于空气中自然晾干，或再次置于酒精灯火焰上方进行空气干燥。

（八）镜检

1. 显微镜调试：先将低倍镜对准通光孔，调节反光镜和光圈，使视野亮度适宜；然后在涂片区域滴加 1 滴香柏油，转换油镜，缓慢调节细准焦螺旋（禁止使用粗准焦螺旋，避免镜头与载玻片碰撞损坏），直至视野中出现清晰的细菌图像。
2. 观察与记录：分别观察大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的形态（杆状、球状）和排列方式（大肠杆菌多单个或成双排列，金黄色葡萄球菌多呈葡萄串状排列），绘制细菌形态图，并记录观察结果。

（九）实验结束整理

1. 清洁镜头：用擦镜纸蘸取少量 95%乙醇，轻轻擦拭油镜镜头上的香柏油，再用干净的擦镜纸擦拭干净。
2. 整理器材：将显微镜恢复原状，放回指定位置；清理实验台，将用过的载玻片、盖玻片等耗材放入指定的污染容器中（后续需高压灭菌处理）；关闭酒精灯，清理实验废弃物。

四、注意事项

1. 全程严格遵守无菌操作规范，接种环、菌种斜面等需正确灭菌，避免杂菌污染涂片。
2. 涂片的厚薄是实验成功的关键，必须制成均匀的薄涂片，否则会影响染色效果和观察结果。
3. 干燥和固定步骤需规范操作，严禁直接烘烤涂片，防止细菌细胞变形。
4. 水洗时水流要轻柔，避免冲掉涂片；染色时间要控制准确，确保着色均匀。
5. 油镜使用时，必须先滴加香柏油，且只能调节细准焦螺旋，防止损坏镜头和载玻片；
6. 实验结束后及时清理实验台，污染耗材需放入指定容器，做好器材归位。

五、实验报告要求

1. 记录实验原理、实验步骤（简要概述）。
2. 绘制所观察到的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的形态图，标注菌种名称、放大倍数、细胞形态和排列方式。

3. 分析实验过程中可能出现的问题及解决方法（如染色过浅、细胞重叠、视野不清晰等）。

4. 总结简单染色法的核心要点和实验体会。

作业布置：

1. 实验有哪些注意事项？

实验八 革兰染色技术

授课章节	实验八 革兰染色技术		
课时安排	3	教学方法	实践法
<p>教学主要内容：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 细菌涂片制作流程（涂片、干燥、固定）； 2. 革兰染色原理及核心试剂作用； 3. 革兰染色规范操作步骤（初染、媒染、脱色、复染）； 4. 革兰阳性菌与阴性菌的染色结果判断及形态观察。 			
<p>教学目的、要求：</p> <p>一、知识目标</p> <p>掌握革兰染色原理及各步骤作用；明确革兰阳性菌与阴性菌的染色差异</p> <p>二、能力目标</p> <p>能独立完成细菌涂片制作及革兰染色全流程操作；能正确使用油镜观察染色结果并准确判断</p> <p>三、素养目标</p> <p>养成严格无菌操作意识；培养严谨实验态度和规范操作习惯；树立生物安全防护理念</p> <p>课程思政： 尊重科学事实、勇于探索真理的精神。</p>			
<p>教学重点、难点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 教学重点：细菌涂片制作规范；革兰染色各步骤（尤其脱色）的操作把控；油镜正确使用； 2. 教学难点：均匀薄涂片的制作；乙醇脱色时间的精准控制；无菌操作意识的落实；染色结果的准确判断。 			
<p>教学过程：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 课前准备（10 分钟）：教师检查菌种（葡萄球菌、大肠杆菌）、试剂、器材完整性；学生分组就座，领取器材，熟悉实验台布局及安全须知。 2. 导入与讲解（15 分钟）：以“细菌分类鉴定的常用方法”导入，简要讲解革兰染色原理、实验目的及核心要点，强调脱色步骤对结果的影响及无菌操作要求。 3. 示范操作（20 分钟）：教师现场示范涂片制作、革兰染色全流程及油镜使用 			

方法，重点演示均匀涂布、火焰固定、乙醇脱色（轻晃载玻片 30 秒左右）、油镜调试等关键步骤，纠正常见错误操作。

4. 学生实操（45 分钟）：学生分组实验，教师巡回指导，重点关注涂片厚度、脱色时间、无菌操作等关键环节，及时解决实操问题。

5. 结果观察与记录（10 分钟）：学生用油镜观察染色结果，区分革兰阳性菌（紫色）与阴性菌（红色），绘制形态图并记录。

6. 总结与答疑（10 分钟）：教师汇总共性问题（如染色过浅/过深、细胞重叠），针对性讲解；解答学生疑问，梳理实验核心要点。

实验原理

革兰染色的核心原理是基于细菌细胞壁结构的差异。革兰阳性菌细胞壁肽聚糖层厚且交联度高，不含类脂；革兰阴性菌细胞壁肽聚糖层薄、交联度低，且外层有类脂膜。染色过程中，结晶紫进入细菌细胞后与碘液结合形成结晶紫-碘复合物。乙醇（脱色剂）能溶解革兰阴性菌细胞壁类脂，使细胞壁通透性增加，结晶紫-碘复合物被洗脱；而革兰阳性菌细胞壁类脂含量低，乙醇处理后细胞壁通透性变化小，结晶紫-碘复合物仍保留在细胞内。最后经番红（复染剂）复染，革兰阳性菌仍呈紫色，革兰阴性菌则被染为红色，从而实现两类细菌的区分。

详细实验步骤

1. 涂片制作：

① 载玻片准备：用记号笔在载玻片一端标注菌种名称，滴加 1-2 环无菌生理盐水于载玻片中央；

② 取样涂布：接种环灭菌冷却后，从斜面培养物上挑取少量菌苔，放入生理盐水中研磨均匀，制成直径约 1cm 的均匀薄涂片；

③ 干燥固定：将载玻片置于酒精灯火焰上方 10-15cm 处空气干燥，待完全干燥后，手持载玻片两端快速通过火焰 3 次进行固定。

2. 革兰染色：

① 初染：滴加结晶紫染色液覆盖涂片，染色 1 分钟后，用自来水缓慢冲洗至水流无色；

② 媒染：滴加碘液覆盖涂片，媒染 1 分钟，自来水冲洗干净；

③ 脱色：滴加 95%乙醇，轻晃载玻片 30 秒左右进行脱色，直至流出的乙醇无紫

色为止，立即用自来水冲洗终止脱色；

④ 复染：滴加番红染色液，复染 1 分钟，自来水冲洗干净。

3. 干燥镜检：

① 干燥：用吸水纸/滤纸轻轻吸去载玻片表面水分，自然晾干；

② 镜检：在涂片区域滴加 1 滴香柏油，调节光学显微镜，从低倍镜逐步转换至油镜，微调细准焦螺旋至视野清晰，观察并区分革兰阳性菌（紫色）和革兰阴性菌（红色）的形态及排列方式。

4. 实验收尾：清洁油镜镜头，整理实验器材，将污染耗材放入指定容器。

简化概括实验步骤如下：

1、制片：取菌种培养物常规涂片、干燥、固定。

2、初染：于制片上滴加结晶紫染液，染色 1min 后，用水洗去剩余染料。

3、媒染：用碘液冲去残水，并用碘液覆盖约 1min，水洗。

4、脱色：用滤纸吸去玻片上的残水，将玻片倾斜，在白色背景下，直接用 95% 乙醇从载玻片上端冲洗脱色，直到流下的酒精无明显的紫色时，立即水洗。酒精的浓度、用量及涂片厚度都会影响脱色速度。脱色是革兰氏染色中最关键的一步。

5、复染：滴加番红液，染色 2min，水洗。

6、用滤纸吸干，油镜镜检。

注意事项：

1. 全程遵守无菌操作，接种环灭菌后需冷却再取样，避免烫死细菌；

2. 涂片需均匀稀薄，防止染色不均、细胞重叠影响观察；

3. 干燥、固定需规范，严禁直接烘烤涂片，避免细菌细胞变形；

4. 严格把控各染色步骤时间，尤其乙醇脱色需精准（30 秒左右），避免过度或不足导致结果误判；

5. 油镜使用前需滴加香柏油，仅调节细准焦螺旋，防止损坏镜头和载玻片；

6. 实验结束后及时清理实验台，污染耗材需放入指定容器，做好器材归位。

作业布置：

1. 实验有哪些注意事项？ 2. 革兰染色中乙醇脱色的核心作用是什么？若脱色过度或不足，会对结果产生哪些影响？