

YUFANG SHOUYIXUE SHIYAN JIAOCHENG

预防兽医学 实验教程



田丽红 主编

东北林业大学出版社

预防兽医学实验教程

田丽红 主 编

东北林业大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

预防兽医学实验教程/田丽红主编—哈尔滨:东北林业大学出版社,2008.6

ISBN 978-7-81131-144-0

I. 预… II. 田… III. ①兽医学:预防医学②兽医卫生检验 IV. S851

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 088024 号

责任编辑:姜俊清

封面设计:彭 宇



NEFUP

预防兽医学实验教程

Yufang Shouyixue Shiyān Jiāocheng

田丽红 主编

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

东北林业大学印刷厂印装

开本 787×1092 1/16 印张 11.75 字数 270 千字

2008 年 6 月第 1 版 2008 年 6 月第 1 次印刷

印数 1—1 000 册

ISBN 978-7-81131-144-0

S·484 定价:20.00 元

《预防兽医学实验教程》编委会

主 编 田丽红

副主编 曾祥伟

主 审 肖向红 华育平

参 编 马 波 倪洪波

前 言

近年来，动物传染性及人畜共患性疫病频繁暴发，使预防医学越来越凸显其重要地位。预防兽医学是动物医学重要研究方向，包括兽医微生物学、动物免疫学及动物传染病学等学科。预防兽医学实验课对动物疾病的诊断、预防和治疗等工作能力的培养有重要意义。

本教材在编写过程中，注重多学科的有机结合，将兽医微生物学实验、动物免疫学实验及动物传染病学实验有机组合为一体，力求做到内容简明扼要。在原则上与理论教材保持一致的前提下，对实验内容进行合理的删减和整合，注重实验内容的连续性和完整性，尽量符合临床检验及科学研究的实际程序；同时注重实用性，适合国内大多数院校实验课的开出能力、专业培养需要及实践教学改革需要，并根据地域和季节差异，适当增加一些机动实验；另外注重基本实验技能的培养，并突出了学生独立工作能力的训练。因此，本教材适用于动物医学、兽医卫生检验等专业本科和专科预防兽医学方向的实验教材，也可作为兽医院、动物防疫站、动物疾病科研单位工作人员的参考书。

本书由肖向红教授和华育平教授精心审阅和修改，田丽红主编。编写分工：马波（东北农业大学）第一篇第八章；倪洪波（黑龙江八一农垦大学）附录全文；曾祥伟（东北林业大学）第一篇中第九章、第三篇全文；田丽红（东北林业大学）第一篇第一、二、三、四、五、六、七章和第二篇各章，并负责全书内容和格式的调整和修改。

鉴于编者水平有限，书中不足之处敬请广大读者指正。

编 者
2008年3月

实验须知

预防兽医学实验课的目的是训练学生掌握预防兽医学最基本的实验操作技能，加理解课堂讲授的理论知识。通过实验，培养学生观察、思考、分析问题和解决问题的能力，培养学生实事求是、严肃认真的科学态度以及勤俭节约、爱护公物的良好作风。预防兽医学实验的对象多为具有传染性的病原体，因此要求学生进入实验室后必须严格遵守以下规则：

1. 每次实验前须对实验内容进行充分预习，以了解实验的目的、原理和方法，做到心中有数，思路清楚。

2. 进入实验室应穿好实验服。认真及时做好实验记录，对于当时不能得到结果而需要连续观察的实验，则需记下每次观察的现象和结果，以便分析。

3. 实验室内应保持整洁、勿高声谈话和随便走动，保持室内安静。

4. 实验时小心仔细，全部操作应严格按操作规程进行，实验中发生差错或意外事故时，应立即报告老师及时处理，切勿隐瞒或自作主张不按规定处理。如万一发生有菌（毒）材料污染桌面、衣物等，应立即用抹布浸沾2%~3%来苏尔（或5%石炭酸液），泡在污染部位，经半小时后方可抹去。如手上沾有活菌也用上述消毒液浸泡10 min左右，再以肥皂及自来水反复洗净。

5. 实验过程中，切勿使酒精、乙醚、丙酮等易燃药品接近火焰。如遇火险，应先关掉火源，再用湿布或沙土掩盖灭火，必要时用灭火器。

6. 要爱护室内仪器设备，按使用规则操作，并应节约使用实验材料，用毕后仍放回原处。

7. 每次实验完毕后，必须把所用仪器抹净放妥，将实验室收拾整齐。

8. 每次实验所使用的材料，应标明自己的组别及处理方法，放于教师指定的地点；实验材料未经教师许可，不得携出室外。

9. 每次实验的结果，应以实事求是的科学态度填入报告表格中，力求简明准确，并连同思考题及时汇交教师批阅。观察结果后的实验材料应放置于污物桶，送消毒室处理、洗刷。

10. 实验完毕后，用消毒液及自来水洗手后再离开实验室。注意卫生、水电及门窗的安全。

目 录

第一篇 兽医微生物学

第一章 动物微生物实验常用玻璃器皿的准备	(1)
实验一 玻璃器皿的洗涤、包装与灭菌	(1)
第二章 培养基的制备	(10)
实验一 普通培养基的制备	(11)
实验二 血液琼脂培养基的制备	(14)
第三章 微生物的分离培养	(16)
实验一 病原菌的分离培养	(16)
实验二 细菌的移植与培养性状的观察	(20)
第四章 细菌的形态学检查	(25)
实验一 显微镜油镜的使用及细菌形态的观察	(25)
实验二 细菌抹片的制备及染色	(27)
实验三 细菌的特殊形态结构观察——芽孢染色、鞭毛和荚膜染色	(31)
实验四 细菌大小的测定	(33)
第五章 微生物数量的测定	(36)
实验一 显微镜直接计数法	(36)
实验二 微生物的平板菌落计数法	(38)
实验三 浊度比色法测微生物的生长曲线	(40)
实验四 稀释培养技术	(41)
第六章 细菌生理生化反应	(43)
实验一 常用细菌生化试验	(43)
第七章 其他技术	(49)
实验一 细菌对抗生素的敏感实验	(49)
实验二 菌种保存	(51)
第八章 动物常见病原微生物的实验室鉴定	(54)
实验一 葡萄球菌	(54)
实验二 链球菌	(56)
实验三 肠杆菌科	(58)
实验四 梭状芽孢杆菌	(62)

实验五 丹毒杆菌与李氏杆菌	(66)
第九章 病毒学实验	(69)
实验一 病毒的电子显微镜观察	(69)
实验二 病毒的超速离心法提纯	(72)
实验三 病毒的鸡胚培养	(74)
实验四 病毒的血凝和血凝抑制试验	(77)
实验五 鸡胚原代细胞的培养	(80)
实验六 传代细胞的培养	(82)
实验七 细胞培养接种病毒及细胞病变观察	(83)
实验八 病毒感染力的滴定	(85)
实验九 病毒的 PCR 检测技术	(87)
实验十 噬菌体的分离与纯化	(89)

第二篇 动物免疫学

第一章 动物实验技术	(92)
实验一 动物试验法	(92)
第二章 血清学技术	(100)
实验一 抗血清的制备	(100)
实验二 血清免疫球蛋白的粗提	(102)
实验三 免疫电泳	(104)
实验四 凝集反应	(106)
实验五 沉淀反应	(109)
实验六 酶联免疫吸附技术	(111)
实验七 免疫荧光技术	(114)
实验八 微量法补体结合试验	(116)
实验九 总 E - 玫瑰花环形成实验	(120)

第三篇 动物传染病学

实验一 消毒	(122)
实验二 免疫接种	(125)
实验三 病料的采取、保存、运送和处理	(130)
实验四 巴氏杆菌病的诊断	(133)
实验五 布氏杆菌的检疫	(135)
实验六 牛结核病的诊断	(138)
实验七 猪瘟的诊断	(139)

实验八 鸡新城疫的诊断和免疫监测	(142)
实验九 禽流感的诊断	(145)
实验十 鸡传染性发氏囊病的诊断	(151)
实验十一 鸡白痢的检疫	(154)
实验十二 鸭瘟的诊断	(156)
实验十三 犬瘟热组织脏器灭活苗的制作	(157)
实验十四 水貂阿留申病的诊断	(159)
附录一 实验常用培养基的配方及配制方法	(162)
附录二 实验常用染液及指示剂的配制	(169)
附录三 微生物实验常用试剂及消毒剂的配制	(174)
参考文献	(177)

第一篇 兽医微生物学

第一章 动物微生物实验 常用玻璃器皿的准备

微生物实验室应用的玻璃器皿种类很多，大多要进行消毒、灭菌来培养微生物，因此在选购时应注意其规格和质量。要求玻璃器皿表面游离碱含量少，最好为中性，并且能够耐受多次高热灭菌而不破裂。在使用前玻璃器皿必须干燥清洁，绝对无菌；对玻璃器皿的洗涤、包装及灭菌方法均有一定要求。不同使用情况的玻璃器皿洗涤方法也不尽相同，若采用的方法不当会影响实验结果。不同形状的玻璃器皿包装方法也不同，但以防止环境微生物污染为准。目前，一些玻璃器皿被一次性塑料产品代替，但玻璃器皿因其质量品质和可重复利用性仍为实验室重要用具。本章主要介绍微生物实验常用玻璃器皿的种类、规格、洗涤方法、包装及灭菌方法，同时对微生物实验其他一些用具作相应的说明。

实验一 玻璃器皿的洗涤、包装与灭菌

一、目的与要求

1. 熟悉微生物实验常用玻璃器皿的名称和规格。
2. 了解微生物实验其他一些非玻璃用具的名称和用途。
3. 掌握微生物实验常用玻璃器皿的清洗和包装方法。
4. 掌握玻璃器皿干热灭菌操作过程。

二、原 理

为了确保微生物实验结果的确实，要求实验环境、实验所有用具及操作者的操作过程必须绝对无菌。实验所有用具的无菌处理是实验顺利进行的重要环节，把实验器皿清洗干净，保持灭菌后无菌状态，需要对培养皿、吸管等进行妥善包装，试管和三角瓶要做棉塞。清洗方法根据实验目的、器皿的种类、所盛放的物品、洗净剂的类别和玷污程度等的不同而有所不同，不同的器皿包装方法也不同。这些工作看来很普通，如不按规定要求去做，会导致实验的失败。因此本次实验是微生物实验的基本操作。

三、实验材料

1. 器材

常用的各种玻璃器皿、微生物实验其他一些用具、洗涤工具、电热干燥箱。

2. 试剂

去污粉、肥皂、洗涤液、蒸馏水。

四、实验方法

(一) 实验室常用玻璃器皿种类介绍

1. 试管

微生物实验室所用的玻璃试管与化学试验用的玻璃试管有些不同，其管壁要厚些，使用时一般用棉塞塞口。试管没有翻口，避免环境微生物从棉塞与管口的缝隙中进入试管内造成实验材料的污染。根据试管大小和用途不同，有下列三种型号：

(1) 大试管

规格为 $18\text{ mm} \times 180\text{ mm}$ ，可装倒平板用的培养基、制备琼脂斜面、盛装液体培养基及微生物的振荡培养。

(2) 中试管

规格为 $(13 \sim 15)\text{ mm} \times (100 \sim 150)\text{ mm}$ ，装液体培养基培养细菌或做斜面用，也可用于细菌、霉菌和病毒等的稀释和血清学试验。

(3) 小试管

规格为 $(10 \sim 12)\text{ mm} \times 100\text{ mm}$ ，一般用于糖发酵或血清学试验，该试管可以节省实验材料。

2. 德汉氏小管

观察细菌在糖发酵培养基内是否产气时，在小试管内倒置一小套管，规格为 $6\text{ mm} \times 36\text{ mm}$ （图 1.1），此小套管即为德汉氏小管，又称发酵小套管。

3. 小塑料离心管

如 1.1 所示，有 1.5 mL 和 0.5 mL 两种型号，主要用于小量菌体的离心、DNA 或 RNA 分子的检测、提取等。

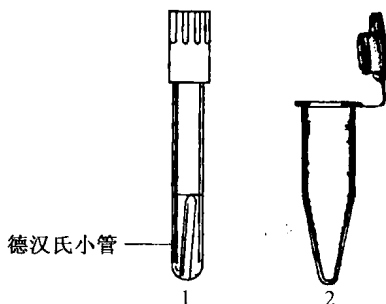


图 1.1 德汉氏小管（1）和小塑料离心管（2）

4. 玻璃吸管

微生物学实验室通常使用 1 mL、2 mL、5 mL、10 mL 刻度的玻璃吸管（图 1.2）。有时需要使用不计量的毛细吸管（又称滴管）来吸取动物的体液、离心上清液以及滴加少量抗原、抗体等。

5. 培养皿

又称平皿，由一底一盖组成一套（图 1.3），常用的培养皿皿底直径 90 mm，高 15 mm，皿底皿盖均为玻璃制成。在培养皿内倒入适量固体培养基制成平板，可用于分离、纯化、鉴定菌种、活菌计数以及测定抗生素、噬菌体的效价等。

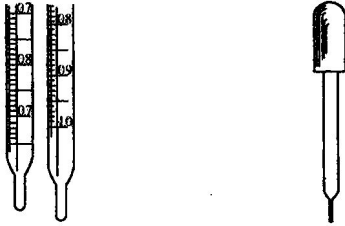


图 1.2 玻璃吸管和滴管

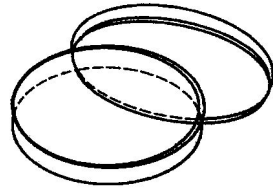


图 1.3 平皿

6. 三角瓶与烧杯

三角瓶有 50 mL、100 mL、250 mL、500 mL 和 1 000 mL 等不同的规格，常用来装无菌水、培养基和振荡培养微生物等。常用的烧杯有 25 mL、50 mL、100 mL、250 mL、500 mL 和 1 000 mL 等，用来配制培养基与各种溶液等。

7. 载玻片与盖玻片

普通载玻片大小为 75 mm × 25 mm，用于微生物涂片、染色、形态观察等。盖玻片为 18 mm × 18 mm。如果在较厚的玻片中央制一圆形的凹窝，就形成了凹玻片。可做悬滴观察活细菌以及微室培养用。

8. 滴瓶

用来装各种染色液、生理盐水等见图 1.4。

9. 双层瓶

由内外两个玻璃瓶组成见图 1.5，内层小锥形瓶装香柏油，使用油镜头观察微生物时使用，外层瓶装二甲苯，用来擦拭油镜头。



图 1.4 滴瓶

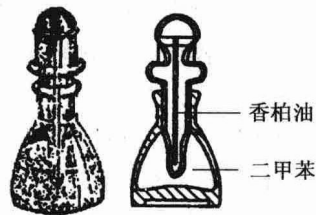


图 1.5 双层瓶

10. 接种工具

接种工具有接种环、接种针、接种钩、接种铲、玻璃涂布器等（图 1.6）。制造接

种针、环、钩、铲的材料是金属，一般为铂或镍，也可用其他金属代替，但要求制作金属具有软硬适度，耐多次火焰灼烧，灼烧后易冷却等特点。制作接种针和接种环所使用的金属丝直径为 0.5 mm 适宜，环内直径 2 ~ 4 mm，环面平整。制作接种钩和接种铲的金属丝直径为 1 mm，用于接种某些不易与培养基分离的放线菌和真菌。玻璃涂布器在琼脂平板上利用涂布法分离单个菌落时使用（它是将玻璃棒弯曲或将玻璃棒一端烧红后压扁制成的）。

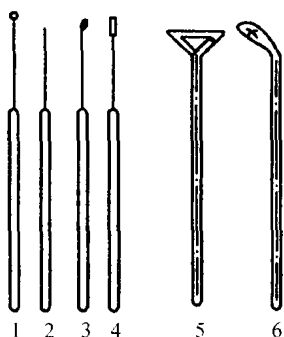


图 1.6 接种工具

1. 接种环； 2. 接种针； 3. 接种钩； 4. 接种铲 5、6. 玻璃涂布器

（二）玻璃器皿的洗涤

根据实验目的、器皿的种类、所装的物品、洗涤剂的种类和玷污程度等，洗涤方法也有所不同。

1. 洗涤液的配制

（1）浓配方

重铬酸钾（工业用）50 g，浓 H_2SO_4 （工业用）1 000 mL。

配法：1 000 mL 工业用浓 H_2SO_4 在文火上加热，然后加入 50 g 重铬酸钾溶解。

（2）稀配方

重铬酸钾（工业用）50 g，自来水 850 mL，浓 H_2SO_4 （工业用）100 mL。

配法：将重铬酸钾溶解在自来水中，慢慢加入浓硫酸，边加边搅拌，配好后，贮存于广口玻璃瓶内，盖紧塞子备用。应用此液时，器皿必须干燥，同时切忌把大量还原物质带入。洗涤液可应用多次，直至溶液变为绿色时，才算失效。

2. 新购置玻璃器皿的洗涤

新购置的玻璃器皿一般含较多游离碱，应在 2% 的盐酸或洗涤液内先浸泡数小时，再用自来水冲洗遗留的酸质，干燥包装及灭后可直接用于细菌的培养。如用于组织培养则干燥后应放于洗涤液内浸泡 1 ~ 2 d，取出后用自来水反复冲洗洗涤，再用蒸馏水洗涤 3 次，三蒸水或去离子水冲洗三次。

3. 使用过的玻璃器皿的洗涤方法

（1）消毒处理

用过的玻璃器皿指培养过微生物或盛过病原微生物以及被病原微生物污染过的玻璃器皿，这些物品在洗涤前必须进行消毒灭菌处理，方法如下：

①平皿、试管、三角瓶、烧杯等一般玻璃器皿置于高压蒸汽锅内，121 ℃ 消毒 20 ~

30 min。

②吸管、载玻片、盖玻片等可浸泡于5%石炭酸、2%~3%来苏尔或0.1%升汞中48 h。

③含有固体培养基、油脂、液体石蜡、凡士林的平皿、试管、三角瓶等，应于高压灭菌后趁热将其中的内容物倒掉，并趁热洗涤。

④含有血清或血液的玻璃器皿，在消毒灭菌前应先将内容物倒入废弃的容器中，并用自来水稍作洗涤，否则其内容物因加热而凝固于容器中，不宜倒出，并易在器皿壁上遗留痕迹。

(2) 洗涤

①试管、培养皿、三角瓶、烧杯的洗涤：可用瓶刷或海绵沾上肥皂或洗衣粉或去污粉等洗涤剂刷洗，然后用自来水冲洗干净。洗涤后，若内壁的水均匀分布成一薄层，表示油垢完全洗净，若还挂有水珠，则需用洗涤液浸泡数小时，然后再用自来水冲洗。含有凡士林或石蜡等的玻璃器皿，必须先除去油污，可在5%苏打液内煮2次，再用热的肥皂水洗刷。若进行精确科研实验，精确配制化学药品，要求自来水冲洗干净后，再用蒸馏水淋洗3次，烘干备用。

②玻璃吸管的洗涤：吸过血液、血清、糖溶液或染料溶液的吸管应立即投入自来水中，免得干燥后难以冲洗干净。若吸管顶部塞有棉花，则冲洗前先将吸管尖端与装在水龙头上的橡皮管连接，用水将棉花冲出，然后再装入吸管自动洗涤器内冲洗，没有吸管自动洗涤器的实验室可用冲出棉花的方法多冲洗片刻，必要时再用蒸馏水淋洗。吸管的内壁如果有油垢，同样应先在洗涤液内浸泡数小时，然后再冲洗。

(三) 玻璃器皿的干燥

洗净的玻璃器皿可放在清洁的木架上，自然干燥，也可放于50~60℃的干燥箱内，迅速烘干。

(四) 玻璃器皿的包装

1. 培养皿的包装

培养皿常用牛皮纸或旧报纸包紧，一般以5~8套培养皿包成1包。包好后干热或湿热灭菌，或者不用纸包装，直接放入特制的金属（不锈钢或铁皮）筒内（图1.7），加盖干热灭菌。

2. 吸管的包装

(1) 塞棉花

在干燥吸管的粗头顶端约0.5 cm处，塞入一小段棉花，长1~1.5 cm（勿用脱脂棉），以免使用时将杂菌吹入其中，或不慎将微生物吸出管外。棉花松紧要合适，过紧，吹吸液体太费力；过松，吹气时棉花则会下滑。

(2) 包装

挑取4~5 cm宽的旧报纸条，将吸管尖端斜放在纸条的一端，与纸约呈45°角，折叠纸条包住尖端，左手握住吸管身，右手将吸管压紧，在桌面上向前搓转，以螺旋式包装，上端多余的纸条打一小结（图1.8）。包好的多支吸管可再用一张大报纸包成一捆灭菌。

干热灭菌时，吸管可不用报纸包装，直接放入不锈钢筒内，只需尖端朝筒底。

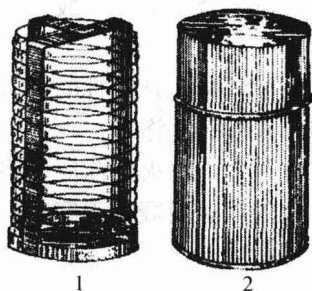


图 1.7 装培养皿的金属筒

1. 内部框架; 2. 带盖外筒

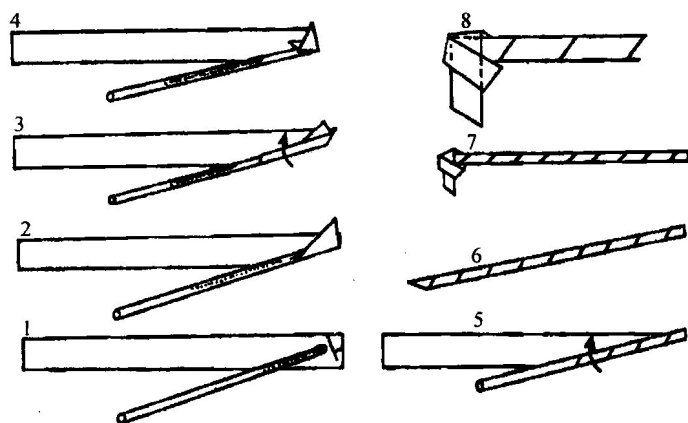


图 1.8 单支吸管的包装流程

3. 试管和三角瓶的包装

试管和三角瓶塞上棉花塞或 8 层纱布制成的“通气式”纱布塞，目的是提供通气条件和防止杂菌污染，灭菌时塞外用牛皮纸或 2 层旧报纸与细线扎好，试管可以多支扎成一捆灭菌。棉塞制作方法见图 1.9，制作棉塞的棉花要求纤维较长，一般不用脱脂棉。加塞时，使棉塞长度的 $\frac{1}{3}$ 在口外， $\frac{2}{3}$ 在口内。

(五) 灭菌

1. 干热灭菌

干热灭菌又称热空气灭菌，它是利用高温使微生物细胞内的蛋白质凝固变性的原理。细胞含水量越大，凝固越快；反之含水量越小，凝固越慢。因此干热灭菌所需的温度和时间要高于湿热灭菌。干热灭菌条件为恒温电烘箱 160°C ，持续 2 h，即可达到灭菌目的。它适用于各种耐热的玻璃空器皿（如培养皿、试管、吸管等）、金属用具（如牛津杯、手术刀等）和某些其他物品（如石蜡油）的灭菌。但带有胶皮、塑料的物品、液体及固体培养基不能用干热灭菌。

(1) 电烘箱结构如图 1.10 所示

(2) 干热灭菌操作方法

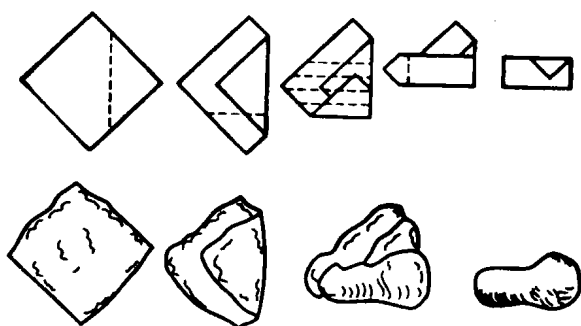


图 1.9 棉塞的做法

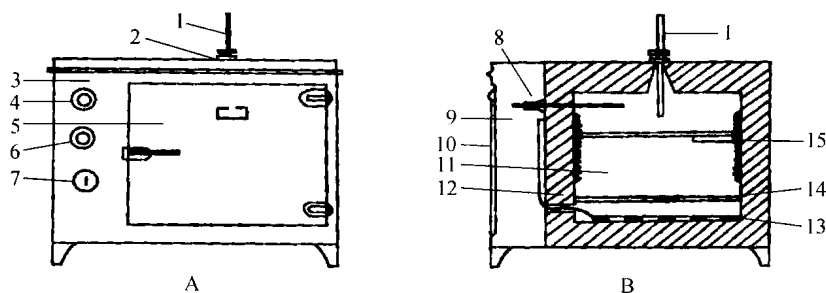


图 1.10 电烘箱的外观和结构

A. 外观 B. 结构

1. 温度计; 2. 排气阀; 3. 箱体; 4. 控温器旋钮; 5. 箱门; 6. 指示灯; 7. 加热开关; 8. 温度控制阀; 9. 控制室 10. 侧门; 11. 工作室; 12. 保温层; 13. 电热器; 14. 散热板; 15. 隔板

①装料：将待灭菌物品包装好放入电烘箱内，关好箱门。

②升温：接通电源，打开电烘箱排气孔，排除箱内湿空气；旋动恒温调节器至红灯亮，让温度逐渐上升。当温度升至 100°C 时，关闭排气孔。在升温过程中，如果红灯熄灭，绿灯亮，表示箱内停止加温，此时如果还未达到 160°C ，则需转动调节器使红灯再亮，如此反复调节，直至达到所需温度。

③恒温：当温度升到 160°C 时，利用恒温调节器的自动控制，保持此温度 2 h。灭菌物品用纸包装或带有棉塞时温度不能超过 170°C 。

④降温：达到规定的时间后，切断电源，自然降温。

⑤取料：待电烘箱内温度降到 60°C 以下，打开箱门，取出灭菌物品。箱内温度未降到 60°C 以前，切勿打开箱门，以免骤然降温导致玻璃器皿破裂。

2. 湿热灭菌

(1) 湿热灭菌原理

空的玻璃器皿一般选用干热灭菌法灭菌，若用湿热灭菌法灭菌，要多用几层报纸包装，外面最好加上一层牛皮纸。湿热灭菌是利用热蒸汽灭菌，在相同温度下，湿热灭菌的效力比干热灭菌好的原因是：

①热蒸汽对细胞成分的破坏作用更强：水分子的存在有助于破坏维持蛋白质三维结构的氢键和其他相互作用弱键，更易使蛋白质变性。蛋白质含水量与其凝固温度成反

比。

②热蒸汽比热空气穿透力强，能更加有效地杀灭微生物。

③蒸汽存在潜热，当气体转变为液体时可放出大量热量，故可迅速提高灭菌物体的温度。

根据灭菌时压力大小可以分为常压蒸汽灭菌和高压蒸汽灭菌。高压蒸汽灭菌将水加热煮沸，并把其中原有的冷空气彻底驱尽后将锅密闭。再继续加热就会使锅内的蒸汽压逐渐上升，从而温度也随之上升到 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上。为达到灭菌效果，一般要求温度达到 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ （压力为 0.1 MPa ），维持 $15\sim 30\text{ min}$ 。也可采用在较低的温度（ $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，即 0.075 MPa ）下维持 35 min 的方法。

在使用高压蒸汽灭菌器进行灭菌时，蒸汽灭菌器内冷空气的排除是否完全非常重要，因为空气的膨胀压大于水蒸气的膨胀压。所以当水蒸气中含有空气时，压力表所表示的压力是水蒸气压力和部分空气压力的总和，不是水蒸气的实际压力，它所相当的温度与高压灭菌锅内的温度是不一致的。

（2）操作方法

①加水：打开灭菌锅盖，向锅内加水到水位线。立式消毒锅最好用蒸馏水，以便减少水垢在锅内的积存。

②装料、加盖：灭菌材料放好后，关闭灭菌器盖，采用对角式均匀拧紧锅盖上的螺旋，使蒸汽锅密闭，勿使漏气。

③排气：加热前，打开放气阀，待水煮沸后，水蒸气和空气一起从放气阀排出。当有大量蒸汽排出时，维持 5 min ，使锅内冷空气完全排净。

④升压、保压和降压：当锅内冷空气排净时，即可关闭放气阀，压力开始上升。当压力上升至所需压力时，控制电压以维持恒温，并开始计算灭菌时间。一般培养基和器皿灭菌控制在 $121.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $15\sim 20\text{ min}$ 。待时间达到要求停止加热，待压力降至接近“0”时，打开放气阀。注意不能过早过急地排气，否则会由于容器内压力下降的速度比灭菌锅内慢而造成容器内液体冲出容器之外。

五、注意事项

1. 干热灭菌

（1）灭菌的玻璃器皿切不可有水，有水的玻璃器皿在干热灭菌中容易炸裂。

（2）灭菌物品不能堆得太满、太紧，以免影响热空气流通。

（3）灭菌物品不能直接放在电烘箱底板上和接触内壁，防止包装纸或棉花被烤焦甚至燃烧。

（4）灭菌温度恒定在 $160\sim 170\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为宜。温度超过 $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，棉花、报纸会烤焦甚至燃烧。

（5）降温时，需待温度自然降至 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下才能打开箱门取出物品，以免因温度过高而骤然降温导致玻璃器皿炸裂。

（6）培养基、橡胶制品、塑料制品等不能使用干热灭菌。

2. 湿热灭菌

（1）不要将灭菌锅安装在有易燃气体或液体的地方，确认仪器所注电压与当地电