

单胞藻培养

附：水蚤等参考资料

淡水渔业专业用

严士良编

厦门水产学院

一九七四年九月

单细胞藻类的培养

目 录

单细胞藻类的培养

I 单细胞藻类培养研究的历史及其与水产养殖业的关系 ——	1
II 单细胞藻类培养意义及发展前途 ——————	3
III 单细胞藻类培养的方式 ——————	4
IV 单细胞藻类的培养方法及原理 ——————	6
一、藻种来源及藻种分离方法 (附: 选种的意义及方法) ——	6
二、器具消毒灭菌 ——————	14
三、培养液的制备 ——————	15
四、接种培养 ——————	22
五、培养管理 ——————	23
六、敌害生物的防治 ——————	24
V 单细胞藻类在培养过程中生长和繁殖的特性及其对指导生产的实践意义 ——————	27
VI 影响单细胞藻类生长繁殖的因素 ——————	31
附录:	
一、木蚕的生产性培养试验 ——————	37
二、为鱼类培养新的饵料 —— 摆蚊幼虫 ——————	42
三、优良的活饵料 —— 盐水半年虫 ——————	46
四、瓢莎 (蕉萍) 的培养和管理 ——————	48

手稿于 1974年6月

苗族經典文化研究

卷一百一十一

Digitized by Google

单细胞藻类的培养

I 单细胞藻类培养研究的历史及其与水产养殖业的关系

大量培养研究在国际上开始于第二次世界大战前后。在这以前，人们为了研究植物的光合作用，也少量培养作实验材料。在第一次世界大战时，德国发生粮食恐慌，战后德国人民还是挨饿，当时就有人提出大量培养小球藻来补充食粮。但未能实施。到第二次大战时，德国人民又遭受军国主义带来的灾难，缺乏食粮。又有人提出要培养小球藻来代替食糧，但提议亦只在实验室里做了一些培养研究，未能真正大面积培养。

二次大战后，美、英、德、日、荷以及苏联都进行了这方面的工作。其目的是为了代食品和代饲料，生产有用的有机物质。

我国于1957年以来，也较普遍地开展了这方面的研究工作，进行了淡水小球藻，海水扁藻，海水小球藻，盐藻，三角褐指藻及其他硅藻类的培养研究。大跃进期间为了解决代饲料的需要，开展了群众性的大面积培养小球藻，栅列藻的生产，60年前后，山东，福建、广东等地开展了海水扁藻的大面积培养，均获得了不少宝贵的经验。

随着海水养殖业的发展，在水产经济动物人工育苗工作中对活饵料的迫切需要，促使单细胞藻培养的进一步发展。目前在贻贝，珠田贝育苗中大量培养扁藻，在对虾生产中大量培养褐指藻，这两种藻类的培养技术都被突破，且具有比较丰富的经验，在生产中已推广使用。

在淡水养鱼生产，苗种培育上，虽小球藻，栅藻的大面积培养已具有成熟的技术，但由于淡水养鱼方法本身就是池塘施肥培育水质，实际上就是培养单细胞藻类和浮游动物等各种活饵料，所以没有重视纯种培养某种单胞藻来培育鱼苗，因此这方面虽也做过些工作，但重视程度不及海水养殖业，但一九七二年陕西省水产研究所报导利用螺旋鱼腥藻（即螺旋颈藻 *Anabaena spiroides*）培养鲤鱼种得到极其快速生长的促长结果来看，对研究池塘浮游藻类的培养，当有新的启示。同时随着养鱼工艺的改革，今后发展到工厂化生产时，那么幼

魚活餌料的供給問題，勢必提上議事日程，單細胞藻類的培养研究，用于養魚生產將會显出其特殊的重要性。

II 单细胞藻类培养的意义及发展前途：

单细胞藻类由于它生长繁殖迅速，能充分利用太阳能，容易培养，并且它含有较丰富的蛋白质，脂肪及多种维生素，这些物质可供饲养动物和供人们直接利用，过去人们想把它当做一种辅助食物来培养，因为和一般农作物相比，它培养时所需要的劳动力少，而收获较高。据说在一般条件比较适宜的情况下，每亩的产量在（干重）万斤以上。如果加强措施，产量还可大幅度增高，据中国科学院水生生物研究所，对栅藻和小球藻的营养分析来看，它们含有粗蛋白为干重的48.04% 和48.3%，油脂为13.5% 和11.3%，这种蛋白质含量是一般农作物所不能比拟的。因此可利用它们为新的代食品。

另一方面由于单细胞藻类中含有多种维生素，氨基酸及抗生素，因此也可以作为提取一些药物和较有希望的新原料。

由于它的营养价值高，培养较方便，在家畜饲料不足的情况下，还可以作为精饲料，掺于一般青饲料中以提高其营养。当前单细胞藻类淡水中主要以小球藻和栅藻为主要培养和研究对象。

基于繁殖生长快速，营养丰富，不少科学家真期望着它，想利用作为人类未来的食物来源，以代替目前的粮食生产。目前在国际上，也有很多人正在从事这方面的研究。在培养藻类除了上述生产有用的有机物质，作为饲料和代食品外，也有研究培养一些固氮藻类用以增加土壤肥力的，也有研究用于污水净化工作为目的的研究。

III 单细胞藻类的培养形式

单细胞藻类的培养按规模大小，可分室内小型培养和室外大型培养两种。

1. 实验室小型培养的目的：培养藻种供应室外大量培养使用；纯种藻种的分离、培养和保藏，以及开展藻类培养为科学的研究等三个方面。

2. 室外大量培养则是生产性的，目前各国采用大量培养的方式有下列二种基本类型，即封闭式和开放式培养。

① 封闭式培养是把培养液密封在透明的容器中，与外界空气隔离。培养容器多为管状，亦有池状。用有机玻璃或透明的聚乙烯塑料做成管道，水平、直立或斜立在地上，暴露在阳光中， CO_2 完全采用人工供给的方法，并利用水泵使培养液不断循环。

例如美国的培养装置，用聚乙烯树脂塑料管，直径 120 厘米，长 21 米，两管水平放在楼房平顶的支架上，两管两端联通构成封闭回路，在离心泵的作用下，藻液在管中循环。封闭式培养设备成本高，但容易控制，产量比较稳定。

② 开放式培养是把藻类培养在露天开放容器中，一般是水泥池， CO_2 可以采用人工供应或依靠与空气的自然交换或通过人工搅动，使空气中的 CO_2 溶解在水中，补充含量。开放式培养方式有可分循环系统、通气系统和不通气三个类型。

开放式循环系统：特点是在藻液通过循环水泵的帮助，不断在循环流动。例如，苏联列宁格勒大学生物系光合作用试验室的培养池是两个末端联通的平行水泥池子，用两个水泵使藻液循环流动，每小时由池底的聚乙烯管道通入 5 分钟的 CO_2 冲气。又例，日本德川研究所的培养水泥池圆形，直径 4—10 米，池中安装一套可以移动的多孔管，用水泵抽出池内培养液，加入 CO_2 和空气后，再从地下管道送回池子的中央，自多孔管孔喷出，由于一种反作用力，使多孔管旋转而造成循环流动。

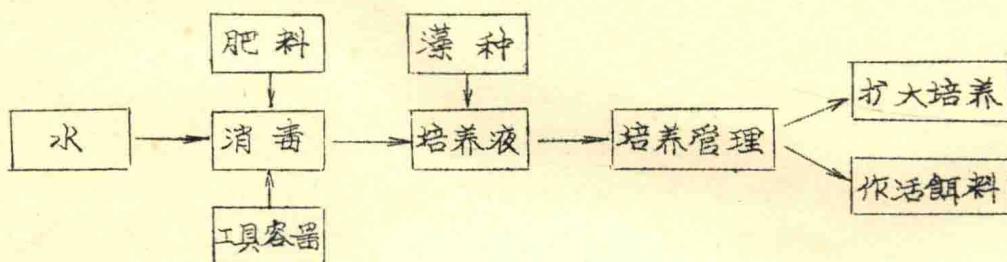
开放式通气系统：特点是藻液不循环流动，定时由小管通入 CO_2 或空气到培养液中，除补充 CO_2 外，还起着搅拌作用，上海水产学院以往培养小球藻的设备即属此类型。

开放式不通气系统，此方式，藻液不循环流动，也不通入 CO_2 和空气，一般只通过定期搅拌使藻液的气体得到补充。这

种方式最简便，因而我国目前较普遍采用这种方式。虽在防止
致害生物污染的条件方面，比封闭式差些，在繁殖速度上也沒有
循环通气系统快，但产蛋也不低。其优点是设备简单，不须动力，
水泵，大量的CO₂及通气系统设备。

Ⅳ 单细胞藻类的培养方法及其原理：

培养单细胞藻类的必要条件，一首先要有培养对象——“藻种”，藻种的获得可以从自然水体中采集得来，进行分离纯化取得，也可向有关科研生产单位索取现存藻种。二需要有水源及必要的工具，器材以及玻璃培养缸或水池等。三需要施肥即培养液的制备，需要一些营养盐类。四经过一定的工作步骤，置培养物于适宜的温度和光照条件下即能培养，加上一定的管理措施，即可获得好的效果。其整个培养工艺过程可用下图示意图说明：



单细胞藻类培养方法可分为室内小规模培养和室外大面积培养两种。

室内培养一般作科研摸索规律，所以工作要求严格，特别表现在消毒灭菌和培养液配制等方面，比大面积生产性培养要求高得多。下面我们着重室内小规模培养方法以及基本原理作一个系统介绍：

一、藻种来源及分离方法：

单细胞藻类的培养，首先需要有藻种。

1. 藻种的来源

省事的方式，可向有关单位索取，加以扩大培养即可。

另外就是从天然水域混杂的生物群中，或在已被生物污染，混杂不纯的藻类中用一定方法，把所需要的藻类个体分离出来，而获得纯种培养。获得纯种培养的方法，称为藻种的分离和纯化又称纯培养法。

真正的纯种培养，是指排除了包括细菌在内的一切生物的条件下进行的培养。纯种培养是科学研究不可缺少的技术，而在生产性的培养中，是不排除细菌存在的，为了区别于纯种培养而称之为单种培养。

在天然水体中选育藻种，第一步就是进行采集，通常可用浮游生物网捞取。由于单细胞藻类细胞很小，即使是最细的~~xx~~
25号筛网，也要大量漏网。所以一般也有直接用广口瓶等容器采集一定量的水，用离心的办法收集标本。(同)

为了便于检查，还可用一小瓶盛装所采集到的部分标本，先用固定液（鲁哥氏液）固定，以后取一滴浓缩液在显微镜下检查，如发现有培养对象的种类，即可用随时采得的标本供分离之用。通常发生“水花”的水体中，藻类数量大，种类也比较单纯，所以如有培养对象的种类，则容易分离。

采集时注意事项：捞网时，拖曳速度不宜太快，注意不要造成回水，以采取S形方式捞取，捞取时间一般5分钟即可。

采集标本要做好记录，时间，地点，同时记上周围环境情况，并编上号码，以备将来查对。采集用的容器（标本瓶）力求清洁，特别注意不能用过去曾装过药物的瓶子（如福尔马林瓶等），以免标本被杀死，无法培养。

2. 藻种的分离

① 藻种分离的意义，其目的为了求得优良品种，并保持其纯化，从而获得高产的可能。

在单细胞藻类培养的生产情况来看，目前单细胞藻类培养中的主要矛盾之一是敌害生物的污染。事实上，在长期培养过程中，绝对地防止污染是不可能的。从哲学上来说，“纯是相对的，不纯是绝对的”。因此污染必然或迟或早会发生的，并在适宜的条件下，一些污染敌害生物，大量繁殖，最终必然导致培养的失败。要解决这个矛盾，就需要不断地补充“纯”藻种，来替代在培养过程中已受污染的藻种，这才较有可能避免敌害生物的大量出现，使培养有较大的保证。所以藻种分离培养是解决敌害问题的关键之一，也是培养工作中重要的一环。

② 藻类分离的预备培养：水样采回后，经显微镜检查，如发现有培养对象这种藻类在水样中数量较多时，即可立即进行分离，若数量很少，分离困难时，最好先进行预备培养，待其数量增多后，再分离。

用作预备培养的培养液，应根据各类藻类不同要求加以选择（参考各类藻类培养液配方）对一些难于培养的种类，一般加入土壤浸出液较好。预备培养液的营养成分的浓度应小些，

一般为原配方的 $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$, 或 $\frac{1}{4}$ 。如果水样中藻类的种类较多，就应使用几种不同的培养液，使藻类在适合于自己繁殖的配方中繁殖起来。因此，为了收集各种藻类，有必要制备各种适合的培养液，特别是对于不容易得到的优良“新”品种，应该使用多种预备培养液，这样，在那一种培养液中，藻类容易繁殖，就可以以这种培养液为基础进行培养及进一步研究更理想的培养液配方。

用以予培养的容器，三角烧瓶与试管皆可，置于室内北窗口下培养。在预培养过程中，根据所需分离藻类的特异，容器可静止不动，因为藻类种类不同，而产生特有的藻群，在培养液中往往有单一的藻群，这藻群移到另一培养容器中，就有可能获得单种或虽不是单种，由于混杂量少，分离较易。在附着藻类的预备培养中应采取这种方法，但一般浮游性种类的预培养中，应该每天摇动一次。⁽¹⁾

根据藻类种类不同，有的在普通培养液中完全不能繁殖，有的繁殖非常困难。这样就得改变培养液的浓度，或加入葡萄糖，蛋白胨等有机物；补充微量元素和辅助生长物质，如加入土壤浸出液，有可能获得好的结果。如以上措施还不能繁殖，这样有必要试用土壤培养液进行培养。

一般在自然界，藻类可以在营养成分很少的水中繁殖，因为在水下有土壤，水中营养被藻类吸收后，被土壤附着的营养成分又溶解出来，这样水中的营养成分虽较少，但能经常的保持一定的浓度。还有在土壤中，含有腐殖质，因此也能补给微量的有机物。土壤培养液是为了接近自然状态的目的制备的，因此，在这种培养液中繁殖的藻类，一般显示了正常的生长型。（制作土壤培养液的土壤，多采自腐殖化了的农田和庭园中的土壤，而粘土、沙以及腐败的有机残渣过多的土壤是不适当的。）

藻类的分类予备培养，也可以采取每隔一定时间（半个月或一个月）采集水样，不需检查，即加肥培养，肥料可参考各类藻类培养液配方，浓度减半使用，每半月又补给一些肥料。培养一段时间后，水中开始有颜色呈现出来，说明藻类已在培养液中大量繁殖生长。可进行显微镜检查，如发现理想种类就可进行分离。这是最常用的预备培养方法。经过预备培养而获得大量繁殖的藻类，适合于在小型静水体中生长繁殖，数量大，

分离也易。

③藻种分离方法。

藻种分离方法，常用有下列四种：

(一)微吸管分离法：微吸管系用小玻璃管在喷灯上拉成口径细的小吸管。将稀释适度的藻液置载玻片上，在显微镜下观察，挑选需要分离的藻类个体，小心用微吸管吸出，放出经消毒并滴有消毒培养液水滴的载玻片水滴中，再在显微镜下检查是否达到单个体分离的目的，如不纯，要反复几次，直到吸出的确实只有一个细胞或单种纯粹的为止。然后用吸管吸取培养液将水滴冲入试管中培养。这种方法，操作要求高，要细心，熟练，往往吸取一个细胞需要反复几次才能成功，适宜于分离个体较大的种类。较小个体用此法较为困难。

(二)水滴分离法：用微吸管吸取稀释适度的藻液，滴到消毒过的载玻片上，水滴尽可能小些，一载玻片3—4滴作直线排列，互相间隔一定距离。在显微镜下仔细检查每一水滴，如某滴水内只有一个或几个所需要分离的藻种，无其他生物混杂，即可用吸管吸取培养液把该滴水冲入装有培养液并经灭菌的试管或小三角烧瓶中去培养，如不成功，反复重做，直到达到目的。

这种分离法，简便，可行。尤其适宜于分离已在培养液中佔优势的种类。水滴分离法在操作上同样要求细致，认真，使用工具及培养液需严格消毒。

(三)稀释分离法：把含有需要分离的藻类而混杂其他生物的水样，取其一定量，用培养液稀释，通过稀释到适宜程度的方法，达到把原混杂生物单个分离培养的目的。

具体做法是把水样稀释到每滴水含有一个左右的生物（也可能一个也没有，也可能有二个三个的），在稀释过程中可用显微镜检查调节稀释度。然后把装有 $1/4$ 容量培养液的试管10支，每管加入稀释好的水样1—2滴，摇匀，进行培养。待藻类生长繁殖一定浓度时，再检查是否达到单种分离的目的。若未达到，再重做。

稀释法操作简单可行。但培养中具有一定盲目性，比不上水滴分离法效果好。

(四)平板分离法：效果好，但较麻烦。具体做法首先要制备

平板培养基，即在选用的无机肥配方的培养液中，还需加入1.5~2% 的琼脂，琼脂需在培养液中浸泡，加热溶化，同时调节PH至平常培养液一样。然后分装于培养皿中，再加以灭菌，最好采用高压灭菌器灭菌。温度124°C 压力1公斤/平方厘米（即15磅/平方吋），灭菌30分钟即可，再将培养皿取出平放桌上，待冷，即成固体平板培养基。如果没有高压灭菌器设备，可用间歇蒸汽灭菌法，即把要灭菌的装有培养基的培养皿，置于常压下蒸煮30~60分钟。随后把它取出在室内放置一天，部分没有死亡的孢子，孢芽由于环境适宜会萌发成营养体，所以需再次蒸煮，如此反复三次，基本上可以达到彻底灭菌的目的。间歇灭菌用具可利用蒸饭菜的蒸笼或用钢精锅装上盛物架子即可使用。

灭菌后冷却的培养基由于琼脂的關係，凝成固体状态。分离方法是在显微镜下，选好分离用的藻液，用灭菌过的水，稀释到适合程度，将稀释的藻液，装入消毒过的小型喷雾器中（可使用医用喉头喷雾器）打开培养皿盖，把藻液喷射在培养基平面上形成均匀的一层水珠。如无喷雾器亦可用划线分离。用铂金，或金属接种环，在酒精灯火焰上灭菌后，蘸取藻液在培养基平面上平行划线。由于蘸到接种环上细胞较多，第一次划线区，藻类可能分离不开，但第二第第三次划线区，可能分离出孤立的细胞以后形成孤立藻类群落来。

喷射或划线接种后，立即盖上培养皿盖，置于适宜光照条件下培养，经过十余天培养，就可以在培养基上发生互相隔离的藻类群落。通过显微镜检查，寻找需要的纯粹群落，然后用消毒过的玻璃微针或金属接种环从培养基上取出移植到装有培养液并经灭菌的试管或小三角烧瓶中加消毒棉塞培养。

用上述分离方法分离出来的藻类，需放在适宜的光照下培养。一般放在室内窗口附近光线充足处，但需避免太阳直射。培养时每天轻轻摇动1~2次，摇动时切勿把培养液沾湿棉花塞。经过一段时间的培养后，藻类不断生长繁殖的结果，培养液颜色逐渐变绿，浓度逐渐增大，此时再经一次显微镜检查，如无其他生物，才达到单种培养目的了。如还未达到“纯化”，则仍用上述分离法，反复进行分离，直到获得“纯”培养为止。

3 “纯”藻种培养：

获得“纯”培养后，一方面保持一定量的单种培养，并把扩大培养后的“纯”藻种，供应饲料生产使用。另一方面可以把“纯”种作较长时间的保藏，需要时随时取出使用。

“纯”种培养要求很严。培养容器可多备些容积大小不同规格的三角烧瓶，适于逐步扩大培养。容器工具需经煮沸消毒或药物（1%高锰酸钾溶液）消毒后，用沸水冲洗干净。培养液用加热灭菌消毒。接种后瓶口用四层经煮沸消毒的纱布包扎放在适宜的光照条件下培养，每天轻轻摇动2次。大约一星期进行一次接种。

4. 藻种的保藏

单种分离是不容易的，要花费不少精力和时间，一旦取得后，就要设法保藏好。

保藏方法，通常是把藻种接种在琼脂固体培养基上，在弱光条件下培养。接种一次可保藏半年到一年。

其方法步骤如下：

(1) 固体培养基（亦称平板培养基）的制备：固体培养基的调配，溶化，调节PH，分装，灭菌方法和上述平板分离法平板培养基的制备方法完全一样。藻种保藏的培养容器，通常可用试管或三角烧瓶，尤以三角烧瓶在需要使用藻种时，只需把灭过菌的培养液加入，摇匀，即可在原瓶中进行培养。

培养基分装的量试管装量约为管长的1/4，三角烧瓶装量厚度约0.8厘米，分装时可用一端接有橡皮管及玻璃管，并夹有弹簧夹的玻璃漏斗进行，以防培养基沾在瓶口或管口上，分装后，试管口烧瓶口，均须塞入棉塞。棉塞可以过滤空气防止杂菌侵入，并可减缓培养基水分的蒸发。

培养基分装后，进行灭菌，取出。试管应放置平稳处，倾置成斜面，三角烧瓶置放桌上，待冷。

分装灭菌待冷后的固体培养基上即可进行接种。接种首先显微镜检查选出供接种用的纯种藻种，藻种不须稀释，浓度大的好，接种时，将瓶口打开，利用喷雾器把藻液均匀喷射在培养基平面上，塞好瓶口棉塞并用牛皮纸包好。试管也可用接种环螺旋形划线接种。在固体培养基上也可再加培养液，然后接种藻种到培养液中，进行培养保藏，这样可以避免固体培养基干涸，保藏的效果比单用固体培养基好。

固体培养基保藻种的培养，目的是希望保藻较长的时间，因此应在较弱的光照条件下及低温下培养，使藻细胞在培养基上慢生长繁殖，让培养基的营养慢慢地消耗。如急需藻种使用，光照条件可以适当加强。一般经过一、两个月的培养，培养基上形成一片颜色，即可随时使用。使用时可用灭菌过的培养液把固体培养基上的藻种洗下来进行培养。

利用固体培养基保持藻种的时间为半年到一年，因此隔半年或一年接种一次。



附：选种的意义与方法

选种的意义：“种”的问题在农业上很重要。选种，育种在农业上对发展生产提高产量意义十分巨大，同样，在培养单细胞藻类工作中“种”的问题也很重要。

“种”是生物分类上的基本单位。一般来说，生物种间的区别往往表现在很多方面，同一种生物个体，受环境因素的影响，会形成一些性状的差异，具有各种性状差异的个体被区分开，称为“品种”。

一个品种在接种传代过程中，它的许多性状保持相对的稳定性，故生产上能在较长一段时间内使用它，这种性状稳定性称为生物的遗传性。每一种生物在长期或强烈的外界因素影响下，其某些性状会发生或大或小的变化，这种变化称生物的变异性。生物同时具有遗传性和变异性。

遗传和变異是一对矛盾。是对立统一的。毛主席教导我们“对于任何一个具体的事物来说，对立的统一是有条件的，暂时的过渡的，因而又是相对的，对立的斗争则是绝对的。”生物的遗传性是有条件的，相对的。在一定条件下，生物的遗传性即会动摇，而发生某些性状的变化，产生变異。外界条件变化越强烈，发生变異的可能性就越大，变異越深刻，变異是绝对的，永恒的。

单细胞藻类和其他生物一样，在外因影响下，通过内因起作用产生变異，这些性状变異通过遗传性表现于下一代，而形成性状不一的个体，选种，育种工作就是在这性状不一的个体

中，选育出合乎人们生产需要的优良品种来。在单细胞藻类培养过程中，藻细胞个体间的性状差异程度是相当明显的，适应环境的可塑性也是大的，这给选种工作带来了很有利的条件。淡水单细胞藻的选种工作做得较多，也取得一定成效，分离出不少特殊性状的优良的小球藻和栅藻“品种”。如1953年分离出一种耐热的小球藻品种 TX 71105 能耐高温 42°C ，有较高的生长率，能适应于 39°C 下，进行指数生长，又小球藻 TX 115 品种则有异常高的生长率 K 值为 5.8（初步数值）。

选种的方法：选种的途径是多方面，有生产选育，诱变育种，杂交育种等。单细胞的选育过去做得不多，一般用生产选育的方法，在国外，也有应用诱变育种的方法进行小球藻育种的。

生产选育：就是在培养生产中，不必经过人为的特殊处理利用单胞藻自然发生的变异进行藻种选育。例如在扁藻培养中，要选取生活力强，生长快，繁殖迅速的藻种，可以根据良好生长的藻细胞在水中游动活泼，趋光上浮明显的特征与那些上浮沉淀附壁者或游动不活泼的，对光的反应不敏感的个体相区别，而在接种时选择细胞上浮明显时进行，把优质个体筛选下来，如此不断进行，达到选种目的。

又如，在光照较强、温度较高的条件下，使其适应及淘汰，并在其中选取适应力较强，存活下来的个体，继续作适应培养锻炼就有可能获得能适应夏天光照强，高温条件下良好生长的品种。

诱变育种：是通过诱变剂的处理，使藻细胞发生大量变异从中选出具有优良性状的变异个体。

诱变剂有化学诱变剂如亚硝酸，氯芥，硫酸二乙脂，氯化锂，放射菌素 K，乙烯亚胺，过氧化氢……等。也有物理变

用

射线，如紫外线、X射线、钴 60 快中子等。

具体诱变方法，请参阅有关育种专著。

李

二、培养器具的消毒和灭菌：

为防止污染，保证培养过程中藻种纯化，所以培养用的工具器皿都最好要消毒，灭菌。

消毒灭菌方法主要应用加热灭菌和化学药灭菌。

1. 加热灭菌法：加热灭菌是利用高温杀死微生物的方法。不能耐高温的容皿工具如塑料橡胶制品等不能用此法灭菌。

① 直接灼烧灭菌：金属接种环，镊子，试管口，瓶口等可以直接在酒精灯火焰上短暂灼烧灭菌，载玻片小刀等则最好先沾些酒精然后在酒精灯火焰上炙燃，等酒精烧完，也就完成灭菌操作。直接灼烧的优点是简单方便快速效果好。但只适用于小型金属或玻璃工具。

② 煮沸灭菌：把容器工具放锅中加水煮沸灭菌。

③ 烘箱干燥灭菌：将容器工具洗涤清洁，待干燥后，进行包扎及装盒。培养皿试管可用清洁纸包好，吸管用4—5厘米宽的长纸条逐支以螺旋式包扎好。试管三角烧瓶则管口或瓶口塞上棉花塞。将需灭菌的容器工具放进恒温烘箱中，关闭烘箱门，打开通气孔，接通电源，加热。等烘箱内温度达到100—105°C关闭通气孔，继续加热，等温度达160—170°C，控制恒温不变，维持2小时，然后停电。此时切不可即行打开器皿门，必须等器皿内温度逐渐下降到60°C以下才能打开器皿门。在灭菌过程中温度上升下降都不能过急，否则玻璃器皿而炸裂。棉花和纸张在180°C以上会烘焦，所以温度不能超过180°C。

烘箱干烘灭菌只适用于玻璃金属和木质的容器皿，如果器皿中有水分或培养基都不能用此法灭菌。

④ 高压蒸气灭菌：即利用高压消毒器（高压灭菌锅）进行灭菌。此法灭菌最彻底，适用于培养基的灭菌用，具体操作方法如下：

先在锅中注入水分到指定的刻度，将灭菌物品放入锅内，盖上锅盖，按对角线扭紧螺旋，将顶部气门打开，将其他部分开关都关闭，然后接通电源或美头加热，让锅内水分沸腾，当有水蒸气从气门通畅窜出时，关闭气门。关闭气门后，压力表指针开始上升，到15磅时121°C，开始计时，维持20—30分钟，然后灭火。压力表指针退回零时，先打开下部气门，再打开顶门气门，然后揭盖取出灭菌物品。