

高压蒸汽灭菌的原理及注意事项

高压蒸汽灭菌的原理

高压蒸汽灭菌用途广，效率高，是微生物学实验中最常用的灭菌方法。这种灭菌方法是基于水的沸点随着蒸汽压力的升高而升高的原理设计的。当蒸汽压力达到 0.105MPa 时，水蒸气的温度升高到 121℃，经 15 ~ 30min，可全部杀死锅内物品上的各种微生物和它们的孢子或芽孢。一般培养基、玻璃器皿以及传染性标本和工作服等都可应用此法灭菌。

请注意高压蒸汽灭菌的原理：是基于水的沸点随着蒸汽压力的升高而升高的原理设计的。

压力：100kPa，水蒸气的温度：115℃，时间：20min，各种微生物和它们的孢子；

压力：147kPa，水蒸气的温度：121℃，时间：15 ~ 30min，各种微生物和它们的孢子或芽孢；

压力：156kPa，水蒸气的温度：180℃，时间：4h，热原质 (Pyrogen)：热原质即菌体中的脂多糖；

压力：156kPa，水蒸气的温度：250℃，时间：45min，热原质 (Pyrogen)：热原质即菌体中的脂多糖；

压力：156kPa，水蒸气的温度：650℃，时间：1min，热原质 (Pyrogen)：热原质即菌体中的脂多糖；

温度越高，需时越短，热穿透能力越强。一般认定 115℃ ~ 121.3℃，对培养基的成分不产生破坏。

高压蒸汽灭菌锅灭菌使用细节

高压蒸汽灭菌是将待灭菌的物品放在一个密闭的加压灭菌锅内，通过加热，使灭菌锅隔套间的水沸腾而产生蒸汽。待水蒸汽急剧地将锅内的冷空气从排气阀中驱尽，然后关闭排气阀，继续加热，此时由于蒸气不能溢出，而增加了灭菌锅内的压力，从而使沸点增高，得到高于 100℃ 的温度。导致菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。在使用高压蒸汽灭菌锅灭菌时，灭菌锅内冷空气的排除是否完全极为重要，因为空气的膨胀压大于水蒸汽的膨胀压，以致当水蒸汽中含有空气时，在同一压力下，含空气蒸汽的温度低于饱和蒸汽的温度。所以饱和蒸汽的灭菌更彻底。

1. 高压灭菌锅使用前，水须加到水位线；
2. 将需灭菌的培养基、蒸馏水或其它器皿放入灭菌锅内，关闭锅盖，检查排气阀、安全阀状态（上下排气阀打开，安全阀关合，然后加热，方便空气排出，上、下排气阀都同时处于开启状态待有水蒸汽从上、下阀溢出，此状态保持 7、8min 后，即排出空气后上排气阀关合，下排气阀调小，安全阀保持关合状态）；
3. 打开电源，检查参数设置是否正确，然后按下“work”键，灭菌锅开始工作；自动排冷气，到 105℃ 时，底部排气阀门自动关闭，然后压力开始上升；
4. 压力升至 0.15MPa（121℃）时，灭菌锅再次自动放气，然后开始记时，一般培养基灭菌 20min，蒸馏水灭菌 30min；

5. 达到规定的灭菌时间后，关闭电源，打开放气阀缓慢放气；当压力指针降至 0.00MPa 时，放气阀无蒸汽排除时，方可开启锅盖。

6. 注意事项

(1) 汽未放尽前，不得开启高压锅；

(2) 如果灭菌后的培养基在锅内不及时拿出，需在蒸汽放尽后将锅盖打开，切忌将培养基封闭在锅内过夜。

(3) 压力表指针在 0.05MPa 以上时，不能过快放汽，以防止压力急速下降，液体滚沸，从培养容器中溢出。

(4) 操作过程，请注意安全，小心烫伤。

在一个标准大气压下水的沸点是 100 摄氏度，压力越高,与之对应压力下的沸点越高，这里是高压蒸汽锅,说明压力肯定大于一个标准大气压(通常情况下的地表面的大气压强就认为是一个标准大气压)，也就是说高压蒸汽锅肯定要超过 100 摄氏度才能沸腾，才能产生蒸汽。至少要等到水煮沸，排出一分钟左右的蒸汽后再把安全阀关闭，这样可以使高压蒸汽锅里的压力迅速上升，原来沸腾的水因为压力的快速上升而停止沸腾，压力大，沸点高，水蒸汽就变成液体水，而放出大量的汽化潜热，就是高温高压的目的，从而达到杀菌的目的。在同一温度下，湿热的杀菌效力比干热大，其原因有三：

一是湿热中细菌菌体吸收水分，蛋白质较易凝固，因蛋白质含水量增加，所需凝固温度降低；

二是湿热的穿透力比干热大；

三是湿热的蒸汽有潜热存在，每 1 克水在 100℃时，由气态变为液态时可放出 2.26kJ 的热量。这种潜热，能迅速提高被灭菌物体的温度，从而增加灭菌效力。

在使用高压蒸汽灭菌锅灭菌时，灭菌锅内冷空气的排除是否完全极为重要，因为空气的膨胀压大于水蒸汽的膨胀压，所以，当水蒸汽中含有空气时，在同一压力下，含空气蒸汽的温度低于饱和蒸汽的温度。如果压力未降到 0 时，打开排气阀，就会因锅内压力突然下降，使容器内的培养基由于内外压力不平衡而冲出烧瓶口或试管口，造成棉塞沾染培养基而发生污染。要 100 度以上，也就是对应压力下的沸点后才能使水剧烈沸腾，将锅内空气更多的排除。

高压蒸汽灭菌锅操作中常见错误

1. 排气不彻底。在升压前应将锅内冷空气排净，因空气是热不良导体，若不排净，冷空气就会聚集并滞留在灭菌锅中消毒筒的中下部，围绕在待灭菌物的周围。在这种情况下，假若锅内仅排除一半空气，当压力表指针达到 0.105MPa 时，锅内实际温度仅能达到 112℃，比要求的 121℃低 9℃之多，将导致灭菌不彻底，可能造成大面积染菌。（自动的高压灭菌锅上下排气阀都要打开然后加热排空气）

2. 排气软管没有按要求插入灭菌筒的下部，或排气软管断裂、缺失。灭菌锅内的冷空气是通过排气软管排出的，上述情况将造成灭菌筒外的蒸汽直接经排气阀排出锅外，灭菌锅内的空气排放受阻。

3. 消毒筒内物品堆积太紧、太满，阻碍蒸汽的流通和热交换，使容器内升温减慢，造成物体内部杀菌不完全。

4. 升温过快。灭菌的时间是以达到要求温度后的持续时间计算的，但温度的升降过程同样起到杀菌的作用，升降温度过快会通过影响总的积温而影响灭菌效果。另外，升温过快，特别是使用外源蒸汽的情况下，会造成被灭菌物体内部升温滞后于压力表指示温度。

5. 灭菌的物体体积（容量）过大。组织培养中或常规微生物实验中，高温蒸汽灭菌通常要在 121°C （即蒸汽压力约为 $1\text{kg}/\text{cm}^2$ 或 0.105MPa ）下保温 15min 。这一规定仅适用于试管、三角瓶中小于 200ml 容量的。若体积太大，特别是固体培养基，会造成灭菌不彻底，应适当延长灭菌时间。

6. 任意延长灭菌时间。规定的灭菌温度和时间是经过科学试验确定的，只要按照正确的灭菌程序是能达到灭菌目的的。但在实践中常有人为了“保证彻底灭菌”而任意延长灭菌时间。这样忽视了杀菌过程中温度对培养基成分的破坏作用，是得不偿失的。

7. 温度不稳定。灭菌过程中温度（压力）忽高忽低，特别是手提式高压灭菌锅，它没有控温装置，难于控温。操作者可配置调压变压器，通过调节电压控温。此外，还常遇到灭菌锅内加水太少（应加 $2\sim 3\text{L}$ ）；容器内装的溶液量过多（应少于 $2/3$ ）；安全阀失灵等问题。