

生物工艺与工程实验技术

贾士儒 主 编



中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物工艺与工程实验技术/贾士儒主编. —北京: 中国轻工业出版社, 2002.9

ISBN 7-5019-3750-8

I. 生… II. 贾… III. 生物工程-实验技术
IV. Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 056719 号

责任编辑: 李菁

策划编辑: 唐是雯 责任终审: 劳国强 封面设计: 赵小云

版式设计: 丁 夕 责任校对: 郎静瀛 责任监印: 吴京一

*

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

联系电话: 010—65241695

印 刷: 北京市卫顺印刷厂

经 销: 各地新华书店

版 次: 2002 年 9 月第 1 版 2002 年 9 月第 1 次印刷

开 本: 850×1168 1/32 印张: 7.5

字 数: 204 千字 印数: 1—3000

书 号: ISBN 7-5019-3750-8/Q·015

定 价: 20.00 元

·如发现图书残缺请直接与我社发行部联系调换·

前 言

2000年4月6日诺贝尔奖获得者杨振宁博士在题为《中国文化与科学》的讲话中指出：“如果说20世纪是物理学世纪的话，那么21世纪将是生物学世纪。”虽然当今生物技术在高科技中还没有像IT技术那样突出，但谁也否认不了其在高科技中处于的龙头地位。由于在解决资源危机、改善医药卫生与环境条件、保持社会与经济的可持续性发展方面，生物技术具有无法替代的作用。因此，显示出它的重要性。

生物技术是一门多学科、综合性的科学技术。从狭义上讲，生物工程可作为生物技术的重要分支，其侧重于生物反应过程与下游技术，最终目的是建立工业生产过程或进行社会服务。虽然已有的《微生物学实验技术》与《生物化学实验方法与技术》能够满足相关生物工程专业的大学生和研究生进行专业基础实验技能学习与实际应用的需要，但是，从生产的工艺与工程研究的角度看，相关的实验技术类书籍至今还是一个空白，特别是进行相关实验时，例如，发酵液黏度的测定、发酵罐的使用方法、生物传感器的制作与使用等。虽然，这类实验的方法或技术并不复杂，但对于初次接触此类实验或刚刚从事生物工程领域方面开展研究工作的初学者来讲，由于没有可直接借鉴或参考的资料，初次进行此类实验时，还是有一定的难度。因此，为满足专业教学与青年科技工作者从事生物工程方面的研究工作，学习、掌握一定的生物工艺与工程方面的实验方法与技能应该是有意义的事情。

《生物工艺与工程实验技术》一书的主要目的是为轻工类高等院校的生物工程、生物技术和制药工程等专业，以及其他高等院校相关专业的大学生和研究生提供一本实验参考书。在满足专

业实验教学的同时，也为从事生物工艺与工程研究的青年科技人员提供一些方便。

本书是在天津轻工业学院生物工程教研室历年教学工作中编写的实验教材和科学研究工作中所接触到的一些实验技术的基础之上，与齐齐哈尔大学、山东轻工业学院、郑州轻工业学院和大连轻工业学院等院校的有关同志共同完成的。考虑到各个院校实验条件的差别，同时考虑到有些实验装置的选择，注意到了尽可能满足轻工类院校的实际情况。目前我国传统生物工业厂家的检测装置与发达国家的生产厂家相比，还有很大差距，因此，从检测方法上立足简单，方便实用。

考虑到生物工业领域涉及的内容十分广泛，全书将其分为5章。第一章重点介绍了生物反应过程相关参数的检测方法；第二章介绍了反应器的使用方法、培养基的制备、微生物培养过程实验、酶促反应过程实验和工艺过程控制实验；第三章介绍了微生物和酶的固定化技术实验；第四章针对生物工业下游过程技术，介绍了十余种提取与精制技术；第五章重点介绍了环境工程方面的生物实验技术，包括一些发酵废物的处理与综合利用技术。

《生物工艺与工程实验技术》一书由贾士儒主编，天津轻工业学院贾士儒、赵华和赵树欣，山东轻工业学院王瑞明和马霞，齐齐哈尔大学刘晓兰和江洁，郑州轻工业学院刘凤珠，大连轻工业学院孙玉梅参加了编写。赵华参加了统稿工作。研究生肖本义同学绘制了有关图表。另外，本书编写过程中引用了大量同行专家、学者所报道的实验方法或技术，在此一并表示谢意。

《生物工艺与工程实验技术》的编写是一次新的尝试，没有现成的教材或参考书可供参考，且资料多而分散，给编写工作带来较多困难。限于编者水平和时间仓促，错误和不足之处在所难免，希望读者批评指正。

主 编

目 录

第一章 生物工艺过程相关参数的检测	1
第一节 菌体量的测定	1
一、微生物菌体量的测定	1
二、微生物菌体密度的测定	9
第二节 容积氧传递系数的测定	11
一、亚硫酸盐法	12
二、动态法	14
三、葡萄糖氧化法	19
第三节 培养液的黏度与混合特性的测定	20
一、培养液黏度的测定	20
二、搅拌功率的测定	28
三、混合特性参数的测定	32
第四节 其他相关参数的测定	37
一、温度	37
二、压力	38
三、pH	39
四、CO ₂	39
五、液位	40
六、流量	41
七、氧化还原电位	43
八、发酵热（生物热量）	43
第二章 生物培养工艺过程实验技术	46
第一节 不同生化反应器的使用方法	46
一、采用机械搅拌罐培养大肠杆菌	46

二、气升式生化反应器的使用	51
三、中试发酵设备的使用方法	52
第二节 培养基制备实验技术	55
一、淀粉水解糖的制备	55
二、常规灭菌实验	57
三、微波灭菌	63
四、啤酒麦芽汁制备实验	65
第三节 生物工艺过程实验	68
一、谷氨酸发酵中产物生成的调节	68
二、四环素族抗生素的定向发酵	70
三、乳酸反复分批发酵实验	73
四、淀粉质原料酒精发酵	75
五、酵母流加培养实验	76
六、酒精连续发酵实验	79
七、糖化酶摇瓶实验	82
八、葡萄酒的酿制	85
九、啤酒的酿造	92
十、黄酒的酿制	93
十一、果酒调配实验	98
十二、食醋酿造实验	100
十三、酱油酿造实验	104
十四、动物细胞培养实验	110
十五、烟草细胞培养实验	123
第四节 酶促反应动力学实验	126
一、酶促反应动力学参数的测定	126
二、酶连续反应操作技术	135
第五节 发酵过程控制	140
一、过程动态特性及控制	140
二、微生物培养条件的优化	148

三、发酵过程溶解氧浓度的控制	156
四、微生物发酵过程的实时预估控制	159
第三章 固定化实验技术	167
第一节 酶和细胞的固定化实验	167
一、酶的固定化实验	167
二、微生物细胞的固定化实验	173
三、植物细胞固定化	177
第二节 生物传感器	179
一、实验方法	180
二、结果与分析	183
第三节 固定化酶或细胞的应用实验	184
一、果葡糖浆生产实验	184
二、固定化酵母连续生产酒精	187
第四章 生物物质分离与精制实验技术	189
第一节 谷氨酸的分离与精制	189
一、直接常温等电点法提取谷氨酸工艺流程	189
二、操作步骤	190
三、发酵液中谷氨酸含量的测定	190
第二节 醋酸丁酯萃取红霉素实验	190
一、实验步骤	191
二、红霉素化学效价测定	191
第三节 离子交换树脂交换容量的测定	192
一、静态法测定	193
二、动态法测定	193
第四节 柠檬酸提取	194
一、树脂预处理	194
二、柠檬酸提取	194
第五节 糖化酶提取	196
一、过滤	197

二、浓缩和沉淀	197
三、干燥与加工	197
第六节 超滤浓缩实验	197
一、设备与实验流程	198
二、实验步骤	199
第七节 色谱分离技术	199
一、装置	200
二、实验操作步骤	200
第八节 味精结晶实验	202
第五章 环境工程实验技术	204
第一节 UASB 反应器在酒糟处理中的应用	204
一、UASB 反应器的结构	204
二、UASB 反应器启动的基本条件	205
三、操作控制	205
四、反应器的稳定运行	206
五、UASB 反应器有关参数的测定	207
第二节 活性污泥工艺处理有机废水	209
一、常用活性污泥工艺流程	209
二、活性污泥工艺的影响因素	209
三、酒精糟液活性污泥法处理实验	211
第三节 与环境工程相关参数的测定	211
一、溶解氧的测定	211
二、化学需氧量的测定	213
三、生化需氧量的测定	216
第四节 废渣与废气的利用与处理	220
一、固体废料的资源化利用	220
二、生物法净化有机废气	222
主要参考文献	228

第一章 生物工艺过程相关参数的检测

第一节 菌体量的测定

一、微生物菌体量的测定

对于微生物培养与管理、动力学研究及细胞成分分析，微生物菌体量的测定是不可缺少的工作，其测定方法可分为基于细胞物理性质变化的直接法和基于细胞内（或外）成分变化换算而得出的间接法。这些方法有的可迅速得到结果，有的虽精度很高但非常费时，因此在实际使用中应根据使用目的与要求，选择适宜的方法。当微生物细胞以单细胞（无凝集性）形式生长时，培养基中悬浮粒子数的增加可作为生长菌体量；对于霉菌、放线菌等以菌丝体形式生长的，菌体量与悬浮粒子间无对应关系。另外，液态培养基中的不溶成分会影响到菌体量的测定。固态培养中由于载体颗粒的影响，更多的是采用间接法测定微生物菌体量。

（一）质量法

菌体量的测定方法中，质量法是最基本的方法，其测定步骤如下。

1. 取样（培养液量）

通常从 100ml 培养液中可得到 10~90mg 的干菌体，基于此数据可决定取样量并确定称量精度。另外，可根据每一个大肠杆菌细胞的干重为 10^{-13} g 这一数值，决定取样量。三角瓶培养中，最好取全部培养液。从大型发酵罐中取样时应注意菌体可能出现的附壁生长现象。另外，从取样管取样时应去除最初流出的培养液后再取样。对于霉菌培养中菌体量的测定，取样误差占测定误差的主要部分。

2. 菌体分离

(1) 过滤法 根据实验的目的, 选择适宜的滤纸, 过滤装置也极简单、这是过滤法的优点。滤纸可分为深层过滤滤纸和表层过滤滤纸两类。一般定性、定量用纤维滤纸或玻璃纤维滤纸的纤维内部能够保留颗粒, 因此为深层过滤用滤纸。醋酸纤维或硝化纤维制成的隔膜滤纸的表面上孔隙度均一, 能够截留颗粒, 因此分类为表层过滤用滤纸。

由于隔膜滤纸的微孔为过滤液中颗粒覆盖, 使液体过滤速度急剧下降, 因此, 一般隔膜滤纸主要用于细胞数较少时培养液的浓缩和进行微生物分析等工作时的过滤除菌。

通过过滤收集菌体时, 滤纸截留颗粒的性能很重要, 有必要根据细胞的大小、形状选择适宜的滤纸。颗粒的截留量以全部颗粒的 98% 被截留作为选择依据, 隔膜滤纸的孔径范围为 $0.1 \sim 5.0 \mu\text{m}$, 玻璃纤维滤纸为 $0.7 \sim 2.7 \mu\text{m}$, 定性、定量纤维滤纸的孔径范围为 $2.5 \sim 25 \mu\text{m}$ 。

一般细菌、酵母、霉菌等微生物细胞的收集可采用玻璃纤维滤纸。通常将滤纸置于布氏漏斗 (Buchner filter) 中, 进行抽滤。玻璃纤维滤纸可耐 550°C 高温, 并且过滤速度快。滤纸使用前, 应在室温条件下真空干燥, 并称重。

有的样品在过滤前需要进行处理。微生物培养过程使用 CaCO_3 调节 pH 时, 应使用盐酸或乙酸使残留 CaCO_3 溶解。培养基中含有玉米浆 (corn steel liquor) 时, 有时会出现蛋白质沉淀, 加大过滤难度。另外, 培养液的黏度与多糖含量有关, 多糖含量高时黏度会明显增加, 此时可通过加热、添加凝聚剂或水的方法进行处理。作为凝聚剂, 可使用 CaCl_2 或 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 用量为 $1 \sim 3 \text{g/L}$ 发酵液, 必要时可加入定量好的助滤剂。

(2) 离心分离法 一般的离心分离条件是: 酵母量为 $1200 \sim 3000 \times g$, 细菌量为 $5000 \sim 8000 \times g$, 分离时间为 $5 \sim 10 \text{min}$ 。换算为转数 $n(\text{r/min})$ 。以 $3000 \times g$ 为例:

$$n = \sqrt{\frac{3000}{1.11 \times 10^{-5} \times r}} \quad (1-1)$$

式(1-1)中 r 为转轴至离心管中心的距离 (cm)。当细胞浓度很低时, 以细菌为例, 浓度在 10^7 细胞/ml 以下, 离心分离的效果较差。特别是从离心完成后取出过程的操作, 是产生误差的主要环节。水洗涤菌体时, 应注意细胞内成分的渗漏。特别是像枯草杆菌等革兰氏阳性菌体, 洗涤中会出现溶菌现象。洗涤操作最好在 0°C 附近 (以下) 进行, 可采用 1% 胨的水溶液或合成培养液等取代洗涤水。另外, 洗涤可能导致细胞所带的静电性质发生变化, 使细胞沉淀性能变差。

3. 干燥

干燥方法有 105°C 常压干燥, 80°C 或 40°C 减压干燥及冷冻干燥等。一般常压干燥需要 3h 达到恒重, 温度降低 10°C , 干燥时间约增加 1 倍。干燥温度高, 有可能使部分细胞发生分解, 除水分以外的挥发性成分也随之丧失。另外, 由于氧化作用, 总重量也可能增加, 结果与低温 (40°C) 减压干燥的结果相近。进行减压干燥时, 真空干燥器内常放有硫酸或硅酸和五氧化二磷。使用硫酸和五氧化二磷时, 由于减压作用, 两者混合形成雾状, 并与菌体细胞发生反应, 因此应将硫酸和五氧化二磷分别放置干燥器内。硫酸放置于一多孔板上; 五氧化二磷薄薄地铺展在一器皿上, 在空气中放置, 当表面形成皮肤膜状时, 再放入干燥器。冷冻干燥时, 洗涤后的细胞浓度以培养菌体浓度的 5 倍 (610nm 时约等于 10 倍) 为宜。取 3ml 置于称量瓶 (内径 40mm 左右) 中, 放入冰箱冷冻后, 采用小型冷冻干燥器时, 进行一夜干燥, 最终将温度升至 40°C 左右。通入干燥空气的同时, 快速称量。

4. 称重

干燥后细胞很易吸潮, 应在低温下尽快称重。

5. 湿润质量法

菌体的干燥称重法是测量精度较高的方法, 但由于需要培养液

的量较大，干燥时间较长等原因，在操作与管理上不十分方便。对于霉菌菌丝可采用省去干燥操作的称取湿细胞质量的方法。取 20~50ml 培养液，过滤后用滤纸收集菌体，菌丝体从滤纸上剥下后用 2~3 枚新滤纸将成型的菌丝片中的水分压出，反复进行 2 次以上后称重。用滤纸吸水时，可采用滚筒压的方法，以保证受力一致。一般菌体的湿重为干重的 2.5~5.0 倍，如果能事先已知湿重与干重的关系，就可以将所测菌体湿度这一参数用于培养过程的监控，并且得到的湿菌体还可以用于细胞成分分析和生理实验。

6. 含有碳氢化合物培养液中的菌体量的测定

这是较特殊的例子，可采用 Hug 和 Fiechter 的方法。培养液中加入等量的甲醇、丁醇、氯仿混合物 (10:10:1)，在带有塞子的离心管中，充分振荡后， $4500 \times g$ 离心 10min，经水洗涤、离心后， 105°C 干燥至恒重。

(二) 浊度法

1. 原理

采用光学方法进行菌体量测定主要是比浊法 (turbidimetry)。比浊法是指，当白色光通过光孔照射到菌体悬浮液时，会产生光散射和光的透射现象。当利用浊度计测定菌体悬浮液的浊度时，通过测定样品的透射光率和散射光率，可确定菌体悬浮液的相对浓度。

当光通过细胞悬浮液时，入射光的强度为 I ，透射光通过厚度为 h 的悬浮液介质层后的强度为 I_0 ，根据 Lambert-Bear 经验式，以下关系式应成立：

$$I = I_0 e^{-\tau h} \quad (1-2)$$

式中 τ ——浊度 (turbidity)，其可由式 (1-3) 给出：

$$\tau = \rho \tau' \quad (1-3)$$

式中 ρ ——悬浮液中颗粒质量浓度 (mg/ml)

τ' ——浊度系数

当 $h = 1\text{cm}$ 时，

$$\log \frac{I_0}{I} = \left(\frac{\tau'}{2.303} \right) \rho = K\rho \quad (1-4)$$

式 (1-4) 的左边 $\log(I_0/I)$ 为吸光度 (absorbance), 其反映了液体浊度的变化。在普通光电光度计上把 $\log(I_0/I)$ 换算为吸光度刻度标出。对于微生物培养液所测结果常称之为 OD(optical density) 值。进行测定操作时, 应事先针对被监测菌做出标准曲线, 不言而喻, 即使是同一种菌, 也会因菌的生理性质等的不同而改变干重与浊度之间的关系, 当然, 多数情况下其还是相对稳定的。选择测定波长要考虑培养基的颜色, 一般肉汤等用红色滤光片, 无色悬浊液用蓝色滤光片。

K 是与散射光相关的系数, 因此, K 值随光束、波长、试样皿的形状、细胞大小的平均分布、细胞的形状和培养基成分的屈光率等而变化。

2. 制作标准曲线

取约 100ml 菌悬液 (发酵培养液), 其中 20ml 用于浊度测定, 其余测定细胞干重, 以获得细胞干浓度。当原液的吸光度值小于 0.3 时, 应离心浓缩细胞, 然后按原液、原液 $\times 0.8$ 、原液 $\times 0.6$ 、原液 $\times 0.4$ 、原液 $\times 0.2$ 和原液 $\times 0.1$, 用缓冲液或原液离心后所得上清液稀释, 获得吸光度与细胞浓度之间的关系, 吸光度在 0.05~0.3 范围内, 并为一直线。

3. 波长的确定

可选择的波长范围是 300~800nm, 使用中选低波长时, τ' 值较大, 灵敏度好。但一般培养液中短波段吸收能力较大, 为避免这种影响, 故多使用 500~660nm 波长。另外, 由于浊度测定法的优点是迅速, 因此在实际发酵过程分析中常被采用。但是, 在培养过程的中后期, 往往会出现测定值超出线性关系范围。基于这一原因, 使用感度较低的长波段可能效果更好些, 例如, 选用 610nm 和 660nm 波长。

4. 测定中应注意的几个问题

测定与标准曲线制作时应注意如菌体、培养条件、测定条件 (分光光度计、波长等) 的一致, 为保证 K 值一定, 还应注意采

用同一稀释液稀释。当培养条件、测试条件发生变化时，需重新制作标准曲线。培养液中有絮凝现象时，可加入阴离子或非离子型表面活性剂。

(三) 细胞充填容积法 (packed cell volume)

采用如图 1-1 所示的带有刻度的两种离心管，(a) 管为下部

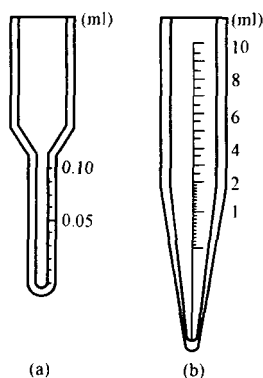


图 1-1 带有刻度的离心管

是毛细沉淀管的离心管，装液量为 5ml，毛细管部分的总刻度为 0.10ml，最小刻度为 0.01ml。(b) 管的装液量为 10ml，最小刻度是 0.1ml。(a) 管适用于细菌、酵母及孢子等，(b) 管适用于霉菌等丝状菌。离心分离条件，以酵母为例 $1200 \times g$ ，10min 即可。为将所获得的细胞容积换算成干重，可取部分培养液采用质量法测定菌体量，然后换算出菌体干重。应用细胞充填容积法测定菌体量时，菌体浓度应足够高。例如，酵母菌的浓度在 10mg 干细胞/ml 左右

为宜。

细胞充填容积法的优点是，可迅速获得结果，对于难以过滤的细胞培养液也能适应，即使培养液中含有不溶性物质，由于离心作用，杂物与细胞分层存在，因此能从刻度上将其扣除。

离心管内细胞的容积因离心条件、容器形状和悬浮液的组成等的变化而变化，例如，含有大量像 NaCl 这样的电解质，会使细胞之间的容量加大。因此，如果能同时进行细胞间容积的测定，可提高测量精度。为进行细胞间容积的测定，需在菌体溶液中加入菊糖、右旋糖酐或聚乙烯吡咯烷酮等不能进入细胞内的物质。离心后去除上清液，采用稀释法测定细胞间填充物的量。

(四) 间接测定法

1. 氮量测定法

一般，细菌的氮含量为 6.5%~13%，霉菌菌丝的氮含量为 4.5%~8.5%，酵母菌的氮含量在 7.5% 左右。根据含氮量再乘以 6.25，可获得菌体的粗蛋白（包括杂环氮和氧化型氮）含量。测定氮含量的方法有很多，如用微量凯氏定氮（Micro-Kjeldal）法、奈氏（Nessler）法、过氯酸和磷酸等消化法和 Dumas 测氮气法。这些方法的特点是取样量不要求很多，如测定细胞量为 1mg，取 10ml 培养液就可以了。这些方法的不足是测定比较费时，并且难以同时测定多个样品。单位细胞的氮含量随培养时间和条件而变化，这在菌体量测定中应充分注意。Dumas 测氮气法是将样品与氧化铜混合，在 CO_2 气流中加热后产生氮气，收集到呼吸器中，用 KOH 吸去 CO_2 后即可测定氮气流。

2. 基于细胞其他成分的测定法

可通过测定细胞中的核酸、过氧化氢酶和二氨基庚二酸（diaminopimelic acid）等的含量，换算为菌体量。测定细胞干重时，常将细胞外成分同时称重，因此在细胞成分分析时，有必要对测定结果进行修正。霉菌细胞壁的主要成分氨基葡萄糖可采用如下方法测定。

取 1 份米曲加 4 份水，加入淀粉酶消化后过滤，加入 HCl 水解，游离出来的氨基葡萄糖通过 Dowex50 的树脂去除其他成分后，比色定量。据报道，菌丝体中氨基葡萄糖的含量为 $110\mu\text{g}/\text{mg}$ 。测定样中的核酸，可通过加入 0.5mol/L 高氯酸，加热处理后在 260nm 的吸光度下测定，然后计算出菌丝含量。

3. 根据胞外物质的变化测定菌体量

培养液中的细胞浓度，可通过培养液中基质的减少，或产物的增加而获得。其中，最为常用的方法是测定氧的呼吸速度 I_{O_2} [$\text{ml O}_2/(\text{g 培养液} \cdot \text{h})$]。大型发酵设备中，通过连续测定通风与排风中氧的浓度变化，可很方便地获得 I_{O_2} ，对于小型培养装置，可采用瓦氏呼吸仪进行测定。若单位菌体的氧呼吸速度为 Q_{O_2} [$\text{ml O}_2/(\text{mg 干菌体} \cdot \text{h})$]，则有：

$$I_{O_2} = mQ_{O_2} \quad (1-5)$$

同样，单位菌体的二氧化碳生成速度为 Q_{CO_2} ，则有：

$$I_{CO_2} = mQ_{CO_2} \quad (1-6)$$

式中 m ——单位培养液中细胞量 (mg 细胞/g 培养液)

Q_{O_2} 和 Q_{CO_2} 随培养时间和条件而变化，在所采用的培养条件范围内，应保证 I_{O_2} 与 m 成比例变化为宜。这一方法对于固态培养特别有效。 I_{O_2} 与培养物的发热量成比例关系，采用热量计可很方便地进行测定。

(五) 细胞数的测定

细胞数的测定方法有多种，包括血球计数板法、库尔特计数法 (Coulter counter)、液体稀释法、平板菌落计数法、MPN (most probable number) 法、延迟增长时间法等。这些方法中有的在微生物实验教材中已有详细论述，这里就不再涉及。

1. 血球计数板法 (haemocytometer)

血球计数板的中部是由 4 条平行槽构成 3 个平台，中间的平台较宽且下陷 0.1mm，其中间又被一短槽隔成两半，每个半边上各刻一方格网，即作为计数板的计数室。计数室的长、宽各为 1mm，盖上盖玻片后，盖玻片与载玻片之间的高度为 0.1mm。所以每个计数室的容积为 0.1mm^3 。稀释样品时以每小格 5 个左右细胞 (2×10^4 细胞/ml) 为宜。操作中，先将盖玻片放在计数室上面，用吸管吸取一滴已稀释好的菌液滴于盖玻片的边缘，让菌液自行渗入。多余的菌液用滤纸吸去。静置 5~7min 让细胞沉淀至计数室底部后在 300~600 倍显微条件下计数。对于有运动性的细菌，菌悬液中加入 4% 聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol) 后再利用血球计数板测定。计数的细节见《微生物实验手册》。

2. 库尔特计数法

(1) 原理 将适当稀释的培养液置于库尔特计数器中含有电解质颗粒溶液的容器中，里边放有一根细管子，在管内与容器内

各安装一电极，以形成电位差。当有电流通过时，电阻的大小取决于细管内电解液的容积。当细胞颗粒通过细管时，电解液的容积发生变化。通过脉冲强度分析仪测定细胞颗粒数。由于脉冲的大小与颗粒直径有关，其可通过购买标准颗粒而获得两者的对应关系。

(2) 应注意的几点 应注意测定管口的直径，以细胞颗粒的直径为管口直径的 2% ~ 10% 时为好。对于细菌、酵母菌，采用管口直径 50 μ m 为好。待测菌体悬浮液及培养基应事先采用 0.25 μ m 孔径的膜或滤纸去除大颗粒杂质。对于需直接测定的培养液，其培养过程需使用棉塞。溶液中的电解质以生理盐水中所含电解质的量为宜。测试液中的颗粒数以 20000 个/ml 以下为好。该仪器可计数到 500 细胞/s。

二、微生物菌体密度的测定

微生物菌体及其悬浮液的密度、黏度等的物理性质是细胞分离、悬浮液输送等物理操作及装置设计上不可缺少的参数。本节介绍微生物菌体密度的测定。有关培养液黏度的测定将在下一节中介绍。

(一) 与密度测定相关的基本概念

设微生物细胞的密度 ρ_m ，则：

$$\rho_m = m/V \quad (1-7)$$

式中 m —— 细胞质量

V —— 细胞体积

如果已知或能够求得细胞的质量 m 与体积 V ，利用式(1-7)可直接求出 ρ_m ，但是，对于微生物而言，准确测定 m 和 V 不是一件容易的事情。因此，首先介绍微生物细胞悬浮液的密度的测定。

设微生物细胞悬浮液的密度为 ρ ，则：

$$\rho = \varphi \cdot \rho_m + (1 - \varphi) \rho_w \quad (1-8)$$

$$\rho_m = \frac{\rho - (1 - \varphi) \rho_w}{\varphi} \quad (1-9)$$