



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106414762 B

(45)授权公告日 2020.03.03

(21)申请号 201580024479.5

(72)发明人 贾森·W·比约克

(22)申请日 2015.05.13

亚当·J·斯塔内纳斯 夏文胜

(65)同一申请的已公布的文献号

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限公司 11219

申请公布号 CN 106414762 A

代理人 王潜 郭国清

(43)申请公布日 2017.02.15

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

C12Q 1/26(2006.01)

61/994,153 2014.05.16 US

C12Q 1/04(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 1/20(2006.01)

2016.11.10

(56)对比文件

(86)PCT国际申请的申请数据

US 4775626, 1988.10.04,

PCT/US2015/030491 2015.05.13

US 2005205840 A1, 2005.09.22,

(87)PCT国际申请的公布数据

CN 101397546 A, 2009.04.01,

W02015/175611 EN 2015.11.19

审查员 高雅

(73)专利权人 3M创新有限公司

权利要求书1页 说明书19页

地址 美国明尼苏达州

(54)发明名称

用于厌氧或微需氧微生物的液体培养的系统和方法

(57)摘要

本发明提供了一种用于培养微需氧或厌氧微生物的培养系统。所述培养系统可包括有效量的i)氧化还原酶家族的酶和ii)用于所述酶的底物，容器，以及支持所述厌氧或所述微需氧微生物的生长的预定体积的含水介质。所述酶可选自抗坏血酸氧化酶和漆酶。所述有效量有效地使所述预定体积中的溶解氧耗尽到有利于微需氧微生物或专性厌氧微生物的生长的浓度。本发明还提供了一种使用所述系统的方法。

1. 一种用于体外非诊断目的的检测空肠弯曲杆菌或大肠弯曲杆菌的方法,所述方法包括:

在容器中形成含水混合物;所述混合物包括含有微需氧微生物的样品,支持微需氧微生物的生长的预定体积的介质,以及氧清除体系;

其中所述氧清除体系包含有效量的i) 氧化还原酶家族的酶以及ii) 所述酶的底物;

其中所述氧清除体系在水合时被激活,从而将所述介质中的溶解氧耗尽到有利于所述微需氧微生物的生长的浓度;

其中所述酶选自抗坏血酸氧化酶和漆酶;以及

在有利于所述微需氧微生物的至少一种细胞分裂的条件下温育所述含水混合物;

其中将所述介质中的溶解氧耗尽到有利于所述微需氧微生物的所述生长的浓度包括将所述介质中的溶解氧耗尽到 $0.01\mu M$ 至 $10\mu M$ 的浓度,其中所述方法还包括检测所述微需氧微生物的生长。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述酶是抗坏血酸盐氧化酶,其中所述底物选自:抗坏血酸或其盐、抗坏血酸的衍生物或其盐、对苯二酚、连苯三酚、邻苯二酚,或前述底物的任两种或更多种的混合物。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述酶是漆酶,其中所述底物选自酚、L-酪氨酸、邻联苯酚和对联苯酚、2,6-二甲氧基苯酚,以及前述底物的任两种或更多种的混合物。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中在形成所述含水混合物之后,所述酶以至少1000单位/升的浓度存在于所述混合物中。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中在形成所述含水混合物之后,所述底物以 $0.1mg/ml$ 至 $100mg/ml$ 的浓度存在于所述混合物中。

6. 根据权利要求1-4中的任一项所述的方法,其中在形成所述含水混合物之前,所述氧清除体系的至少一部分被配置为溶液、片剂、小袋、设置在所述容器的壳壁的内侧表面上的涂层、或粉末。

7. 根据权利要求1-4中的任一项所述的方法,其中将所述介质中的溶解氧耗尽到有利于所述生长的浓度包括将所述溶解氧在60分钟或更短的时间内耗尽到所述浓度。

8. 一种用于空肠弯曲杆菌或大肠弯曲杆菌的培养和检测的培养系统,所述培养系统包含:

有效量的i) 氧化还原酶家族的酶以及ii) 所述酶的底物,其中所述酶选自抗坏血酸氧化酶和漆酶;

容器;以及

支持微需氧微生物的生长的预定体积的含水介质;

其中所述有效量有效地使所述预定体积中的溶解氧耗尽到有利于微需氧微生物的生长的浓度,其中所述有效量有效地使所述预定体积中的所述溶解氧耗尽到 $0.01\mu M$ 至 $10\mu M$ 。

9. 根据权利要求8所述的培养系统,其中所述有效量有效地使所述溶解氧耗尽到 $0.01\mu M$ 至 $1\mu M$ 的浓度。

用于厌氧或微需氧微生物的液体培养的系统和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求2014年5月16日提交的美国临时专利申请No. 61/994,153的优先权,该专利申请的公开内容全文以引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及样品中厌氧和/或微需氧微生物的选择性培养和/或检测,并且特别涉及采用酶-底物系统富集样品中的靶厌氧和/或微需氧微生物(一种或多种)的群体的方法。还公开了有利于进行所述方法的装置。

背景技术

[0004] 微生物通常根据其对氧耐受性的需要分成不同的群。“需氧菌”是需要氧来生长的微生物。“兼性需氧菌”是能够在有氧或没有氧的情况下生长的微生物。另一群微生物包括可在非常低含量的氧的存在下生长的“微需氧细菌”。最后,存在称为“厌氧菌”的一类微生物,其不能耐受氧,因为其可被氧抑制或杀死。氧敏感细菌必须在受控气氛下培养,并且这需要开发用于其培养的方法,所述方法特别针对完全或有限地排除氧。

[0005] 富集培养是通常采用的用以在样品中培养靶微生物并且筛选靶微生物的存在的方法中的一种。常规已知的厌氧培养方法不太适于日常使用,日常使用中需要快速且容易地处理众多且不同的样品,需要以简单、快速且高效的方式实现样品中的厌氧生活的改进方法。食品加工工业将由通过这样的快速、简单且方便的培养方法确定微生物污染而明显受益,所述食品加工工业常规地测试食品和饮料样品中厌氧或微需氧微生物的存在。其他行业也希望有机会通过厌氧细菌以更迅速且有效的方式来检测污染。

发明内容

[0006] 在试图解决此处描述的与培养厌氧和微需氧微生物相关联的问题中的许多时,已经尝试设计出用以通过使用氧清除体系有效地消除或减少氧来在靶样品中培养厌氧菌和/或微需氧细菌以及/或者筛选厌氧菌和/或微需氧细菌的存在的改善方法,该氧清除体系创建对于靶样品中厌氧或微需氧微生物的选择性富集和检测有益的贫氧环境。

[0007] 有利的是,本发明提供了通过在容器中向疑似含有厌氧菌或微需氧微生物的液体介质和样品添加酶-底物系统来成功地培养厌氧菌和/或微需氧细菌的快速、简单且方便的方法,其中所述酶-底物系统在通过水合激活时减少或消除溶解氧,从而使样品中厌氧和/或微需氧生物体的检测和/或富集方便并且比常规方式更容易得多。

[0008] 有利的是,本公开提供了用于培养厌氧菌和/或微需氧细菌的方法,该方法对于产生和维持厌氧条件不需要特殊或昂贵的程序,而事实上,所述厌氧条件可在普通培养器中以较大的商业规模方便且经济地培养。此外,与用于培养厌氧微生物的常规技术(例如,厌氧手套箱、GASPAK气体生成袋)不同,本文所述的本发明的方法直接从液体培养基移除氧,而不是将氧从培养基保持在其中的气氛中移除。

[0009] 另外,本公开提供了易于检测厌氧菌和/或微需氧细菌的方法,该方法以更简单、更经济、有效且方便的方式实现。

[0010] 更进一步地,本公开有利地提供通过以下方式检测厌氧和/或微需氧微生物的方法:使用包括氧化还原酶家族的酶及其底物的氧清除体系创建基本上贫氧环境,从而创建对于所述微生物的富集有益的条件。

[0011] 因此,在一个方面,本公开提供方法。方法可包括在容器中形成含水混合物;该混合物包括含有厌氧微生物或微需氧微生物的样品,支持所述厌氧或微需氧微生物的生长的预定体积的介质,以及氧清除体系。氧清除体系可包括有效量的i) 氧化还原酶家族的酶以及ii) 所述酶的底物。氧清除体系可在水合时被激活,从而将介质中的溶解氧耗尽到有利于厌氧微生物或微需氧微生物的生长的浓度。酶可选自抗坏血酸氧化酶和漆酶。方法还可包括在有利于所述厌氧微生物或微需氧微生物的至少一种细胞分裂的条件下温育含水混合物。在任何实施方案中,方法还可包括检测厌氧微生物或微需氧微生物的生长。在任何实施方案中,检测微生物的生长可包括分析厌氧微生物或微需氧微生物以使厌氧微生物或微需氧微生物与由除了其在含氧环境中生长的能力之外的特征表征的微生物的属、种或群相关联。

[0012] 在另一方面,本公开提供了用于培养微需氧微生物或厌氧微生物的培养系统。该系统可包括有效量的i) 氧化还原酶家族的酶和ii) 所述酶的底物,容器,以及支持所述厌氧或微需氧微生物的生长的预定体积的含水介质。酶可选自抗坏血酸氧化酶和漆酶。有效量可有效地使预定体积中的溶解氧耗尽到有利于微需氧微生物或专性厌氧微生物的生长的浓度。在任何实施方案中,容器可基本上不透氧。

[0013] 在又一方面,本公开提供了试剂盒。试剂盒可包括可密封的容器和氧清除体系,该氧清除体系包含有效量的i) 氧化还原酶家族的酶以及ii) 所述酶的底物。酶可选自抗坏血酸氧化酶和漆酶。在任何实施方案中,有效量有效地使预定体积中的溶解氧耗尽到约 $100\mu M$ 或更少,约 $10\mu M$ 或更少,约 $1\mu M$ 或更少, $0.1\mu M$ 或更少,或者 $0.01\mu M$ 或更少。在任何实施方案中,有效量有效地使预定体积中的溶解氧耗尽到有利于在约60分钟或更短时间内的生长的浓度。

[0014] 在上述实施方案中的任一项中,本发明的氧清除体系在激活后创建基本上耗尽氧或者包含痕量的氧以有利于分别培养专性厌氧菌或微需氧细菌的环境。

[0015] 在本发明的上述实施方案中的任一项中,氧清除体系在激活后允许包含在靶样品中的厌氧和/或微需氧微生物的选择性富集。

[0016] 在上述实施方案中的任一项中,容器可为基本上不透氧的容器。

[0017] 本发明的特征和优点将通过考虑优选实施方案的详细描述以及所附权利要求书而进行理解。如下结合本发明各种说明性实施方案来描述本发明的这些和其他特征及优点。

[0018] 本发明的上述发明内容并非旨在描述本发明的每个公开的实施方案或每种实施方式。下面的具体实施方式更具体地举例说明本发明的示例性实施方案。通过说明书和权利要求书,其他特征、目的和优点将变得明显。

具体实施方式

[0019] 本发明现在将在下文中得到更全面地描述。出于下列详细说明的目的,除了有明确相反规定之外,应该理解的是本发明可假定各种替代的改变和步骤顺序。因此,在详细地描述本发明之前,应当理解,本发明并不限于特别例举的系统或实施方案,所述系统或实施方案当然可改变。本说明书中在任何地方使用的示例或实施例,包括本文所述的任何术语的示例,仅仅是示例性的,决不限制本发明或任何范例术语的范围和含义。同样,本发明不局限于该说明书中给定的各种实施方案。

[0020] 如本文所用,单数形式“一个/一种”和“所述”包括指代复数,除非上下文另有清晰的表示。术语“和/或”意指所列要素的一个或全部,或者所列要素的任何两个或更多个的组合。

[0021] 术语“优选的”和“优选地”是指在某些情况下,可以提供某些有益效果的本发明实施方案。然而,在相同的情况下或其他情况下,其他实施方案也可能是优选的。此外,对一个或多个优选实施方案的表述并不暗示其他实施方案是不可用的,且并非意图将其他实施方案排除在本发明范围之外。

[0022] 当术语“约”用于描述值或范围的端值时,本公开应被理解为包括所提及的具体值或端值。

[0023] 如本文所用,术语、“包括”、“包含”、“具有”、“含有”、“由……表征”、“有”或它们的任何其他变型旨在涵盖非排他性的包含之意。

[0024] 如本文所用,术语“微生物”或“微菌”是指任何微观生物体,其可为单细胞或多细胞生物体。该术语通常用于指能够在合适的培养基中生长和繁殖的任何原核或真核微观生物体,包括但不限于细菌中的一种或多种。由本发明的范围涵盖的微生物包括原核细胞,即细菌和古细菌;以及各种形式的真核生物,包括原生动物,真菌,酵母(例如,厌氧酵母),藻类等。术语“靶微生物”是指期望被检测到的任何微生物。

[0025] 如本文所用,术语“厌氧微生物”或“厌氧菌”是指对氧敏感并且在氧的存在下将不会生长的微生物。厌氧微生物或厌氧菌是不需要氧来生长的生物体。厌氧微生物包括专性厌氧菌和兼性厌氧菌。专性厌氧菌是在暴露于大气水平的氧时会死的那些微生物。兼性厌氧菌是在氧存在的情况下能进行有氧呼吸,但是在氧不存在的情况下能够切换到发酵或无氧呼吸的生物体。本发明的方法和系统可用于专性厌氧菌和兼性厌氧菌两者的富集和检测。

[0026] 术语“微需氧微生物”或“微需氧细菌”在本文中用于指仅在微量的氧存在的情况下生长的任何微生物。微需氧细菌使用氧,但是仅以非常低的浓度(低微摩尔范围)使用氧,通常氧浓度水平为5-15%,其生长被正常氧浓度或大于约15%的氧浓度抑制。

[0027] 如本文所用,微生物的术语“培养”或“生长”是指通过使微生物体在预定培养基中在对于其生长有益的条件下繁殖来使其倍增的方法。更具体地讲,其为提供合适的培养基以及有利于微生物的至少一种细胞分裂的条件的方法。培养基是包含微生物生长所需的所有营养物和必需物理生长参数的固体、半固体或液体介质。

[0028] 如本文所用,术语“富集”是指通过以下方式选择性地富集特定微生物的生长的培养方法:提供具有有利于该特定微生物的生长的特定的和已知属性的介质和条件。富集培养的环境将支持所选微生物的生长,而抑制其他微生物的生长。

[0029] “氧清除剂”、“氧清除体系”、“酶-底物系统”将在本文中广义地用于指可消耗、耗尽或与来自给定环境的氧反应的系统。优选地，氧清除体系包含具有有效量的氧化还原酶家族的酶和所述酶的底物的酶-底物系统，并且能够在激活后主动地从给定环境移除氧。

[0030] 术语“激活”或“激活的”是指其中氧清除体系能够清除氧的状态，如在本文中的本发明中所述。根据本发明，引起酶的催化作用的激活方法通常通过水合进行。优选地，根据本发明，水合通过与液体介质或样品接触而进行。

[0031] 术语“失活”或“失活的”是指氧清除体系不能够清除氧的状态。氧清除体系通常维持在“失活”状态直到接近或重合于将含微生物样品添加到介质中的时刻，以便保持氧清除体系的酶活性并且防止所述系统在靶样品或介质中的氧清除开始之前过早激活。

[0032] 氧清除体系的最少组分包括能够还原分子氧的酶以及所述酶的适当底物。优选地，所述系统包含有效量的氧化还原酶家族的酶及其合适的底物。更优选地，可用于本发明中的酶底物系统涉及使用氧化还原酶家族的酶，所述酶选自抗坏血酸盐氧化酶、漆酶或它们的组合。

[0033] 术语“还原底物”、“底物”和“还原剂”在本文中可互换使用，并且各自是指能够充当包括在本发明的氧清除体系内的酶的电子源的物质。

[0034] 本公开整体涉及用于使厌氧或微需氧细菌生长的制品和方法。具体地讲，本公开提供用于培养厌氧或微需氧细菌的系统。系统包含有效量的还原分子氧的氧化还原酶以及在氧消耗反应中氧化的对应底物。有利的是，本发明的系统是高度稳定的（例如，在环境温度下）并且系统避免对专用设备和/或压缩气体的需要以便实现并维持厌氧环境。另外，系统能够在该系统被激活后不到一小时创建有利于厌氧或微需氧微生物的生长的液体环境。

[0035] 很大程度上已知的是，在被设计用于人类消费或使用的产品中存在细菌污染的可能性。预期用于人类消费的产品的制造商和/或处理商通常测试这些产品以确保供人类消费的产品的质量和安全。对食品、药品、饮料、化妆品和水常规地测试病原微生物（包括厌氧和微需氧细菌）的微生物污染。

[0036] 传统上，厌氧菌的富集和培养已经非常困难，这是由于需要排除氧气，生长缓慢以及复杂的生长需求。需要将厌氧培养基维持在完全无氧条件下，并且这需要采用繁琐的物理和化学技术。为此，厌氧细菌的筛选、培养和实验室维护需要专用培养容器、温育设备、介质，这使得该方法非常耗费劳力、昂贵且耗时。另外，这些装置的操作也通常需要精心设计的设置程序，从而需要熟练技工。出于这些原因，食品/水或其他生物样品对厌氧微生物存在或不存在的常规测试已变得非常繁琐，从而阻碍了它们的常规使用。

[0037] 传统上已用于实现厌氧生活的方法包括物理和化学技术，比如使用厌氧室，排除氧或产生真空，涉及氧气与其他气体的置换的喷射技术，使用还原剂，通过化学或生物方式吸收氧以及还原氧。

[0038] 厌氧室是例如包含H₂、CO₂和N₂气氛的塑料手套箱。培养基通过空气锁放置在室内，所述空气锁可被排空并且用N₂重新填充。

[0039] 创建厌氧环境的另一种常规方法是通过在真空干燥器中温育培养物，但该方法的大规模适应已由于无法实现完整的厌氧生活而受到限制。

[0040] 依赖于氧气置换原理的传统烛罐是又一种普遍但无效的方法。采用的方法包括将接种板放置在较大气密容器内，并且将点亮的蜡烛在封盖被密封之前保持在该气密容器

中。虽然通常预期的是，燃烧的蜡烛将在其熄灭之前用尽所有可用的氧气，但实际上，总是留下痕量的氧气。

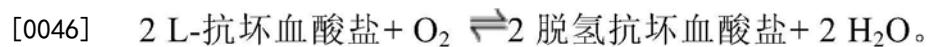
[0041] 从液体介质移除氧的另一种方法是通过添加还原剂来进行的。但是这些试剂中的大多数是强还原剂并且存在于介质中的任何残余试剂都趋于抑制厌氧菌在介质中的后续生长。

[0042] 通过其他化学方式实现厌氧生活已尝试采用化学品的混合物；即包含焦性没食子酸/氢氧化钠的混合物、包含铬/硫酸的混合物、包含硼氢化钠/氯化钴的混合物或包含柠檬酸/碳酸氢钠的混合物（例如，如在GASPAK气体生成袋系统中），由此产生氢气和二氧化碳。氢然后与氧气在钯催化剂上反应以产生更多的水，从而移除氧气。一些经常遇到的限制此类化学方法使用的缺点包括一氧化碳的释放，这可以抑制对这些气体敏感的一些细菌的生长。特别是在采用GASPAK气体生成袋系统中的又一限制是在催化反应期间形成的较大体积水的生成和管理。

[0043] 用高纯度的氮气或其他惰性气体对液体介质进行鼓泡可有效地从液体介质移除氧。但是该方法通常导致液体介质发泡以及相关联的机械问题。此外，在鼓泡停止之后，介质易于被氧再次污染。现代厌氧实验室仍适应于以充气站的形式使用这种技术。但是充气站不可商购获得，而必须定制。这相对于成本和时间提出巨大的挑战。

[0044] 清楚的是，常规方法需要使用相对昂贵的设备连同花费大量时间、劳力和技能，然而在实现完全厌氧生活方面通常是无效的。

[0045] L-抗坏血酸氧化酶/抗坏血酸盐氧化酶是属于氧化还原酶(EC1.10.3.3)家族的多铜酶，其用底物（即，抗坏血酸盐或抗坏血酸）的伴随单电子氧化来催化氧到水的四电子还原。该酶催化化学反应，该化学反应包括但不限于示于以下示例性反应中的反应物（“底物”）和产物：



[0047] 因此，示例性反应中的L-抗坏血酸氧化酶/抗坏血酸盐氧化酶的两种底物是L-抗坏血酸盐和O₂，而其两种相应产物是脱氢抗坏血酸盐和H₂O。

[0048] 在任何实施方案中，抗坏血酸盐氧化酶的底物包括抗坏血酸及其盐，特别是碱性金属盐。在本发明中，抗坏血酸化合物的示例包括L-抗坏血酸、L-抗坏血酸钠、L-抗坏血酸钙和D-异抗坏血酸钠D，并且它们可单独使用或以其混合物的形式使用。已知抗坏血酸氧化酶催化与抗坏血酸衍生物及其盐，以及与非抗坏血酸底物的氧消耗反应。抗坏血酸衍生物的非限制性示例包括D-异抗坏血酸盐、D-阿拉伯糖型抗坏血酸、6-氨基-L-抗坏血酸盐、6-脱氧-L-抗坏血酸盐、D-赤型抗坏血酸盐、6-邻苯基-L-抗坏血酸盐和6-S-苯基-L-抗坏血酸盐。非抗坏血酸盐底物的非限制性示例可包括对苯二酚、连苯三酚、邻苯二酚等。术语“抗坏血酸”和“抗坏血酸盐”将在本文中互换使用以指抗坏血酸及其盐两者。

[0049] 漆酶是指多铜氧化还原酶(EC 1.10.3.2)，其用底物的伴随单电子氧化来催化氧到水的四电子还原。

[0050] 已知漆酶氧化宽范围的酚类分子，以及一些小的非酚类分子。因此，在本公开的氧清除体系中适于与漆酶一起使用的底物包括但不限于酚、L-酪氨酸、邻联苯酚和对联苯酚。

[0051] 在一个方面，本公开提供用于培养微需氧微生物或厌氧微生物的系统。在任何实施方案中，所述系统可包括有效量的氧化还原酶家族的酶以及所述酶的底物，并且所述酶

和底物系统在通过与液体介质接触而水合时被激活,从而创建基本上耗尽氧、对于厌氧或微需氧微生物的生长有益的含水环境。在任何实施方案中,如本文所用,“基本上耗尽氧”的含水环境是指这样的含水环境(例如,含水缓冲剂或培养基),在含水环境中的酶和底物系统的激活之后,该含水环境包含小于50%的在激活酶和底物系统之前存在于含水环境中的溶解氧。

[0052] 用空气饱和的充分混合含水液体在30°C R.A下包含约470μM溶解氧。Ludwig (“Mesophilic bacteria transduce energy via oxidative metabolic gearing”, Research In Microbiology, vol.155 (2004) ,pp.61-70 (“嗜温细菌经由氧化代谢传动转导能量”,《微生物学研究》,第155卷,2004年,第61-70页))公开了需氧微生物的代谢活性的速率在低于约10μM的溶解氧浓度下显著降低并且在低于约0.2μM的溶解氧浓度下基本上停止。相反,Ludwig公开了微需氧微生物在溶解氧浓度在约0.001μM至约200μM范围内的环境中表现出代谢活性,其中最高代谢活性在溶解氧浓度在约0.05μM至约10μM范围内的环境中。另外,Ludwig公开了严格厌氧微生物在溶解氧浓度小于或等于约0.005μM的环境中表现出最高速率的代谢活性。严格厌氧菌的代谢活性在溶解氧浓度大于约0.2μM的环境中基本上停止。

[0053] 本领域中的普通技术人员将认识到,溶解氧可使用本领域中已知的各种技术(例如,溶解氧监测仪和探针)在含水液体中测量。

[0054] 在用于富集微需氧微生物和/或厌氧微生物的方法的任何实施方案中,如本文所用,“基本上耗尽氧的”含水环境是指这样的含水环境(例如,含水缓冲剂或培养基),在含水环境中的酶和底物系统的激活之后,该含水环境的溶解氧浓度小于或等于约100μM,小于或等于约50μM,小于或等于约10μM,小于或等于约5μM,小于或等于约1μM,小于或等于约0.5μM,小于或等于约0.1μM,小于或等于约0.05μM,小于或等于约0.01μM,或者小于或等于约0.005μM。

[0055] 可使用本公开的方法、系统或试剂盒以有利于微需氧微生物的生长超过需氧微生物的生长。因此,在根据本公开的富集和/或检测微需氧微生物的方法的任何实施方案中,基本上耗尽培养基中的氧可包括将溶解氧耗尽到介于约0.01μM和约10μM之间的浓度。在根据本公开的富集和/或检测微需氧微生物的方法的任何实施方案中,基本上耗尽培养基中的氧可包括将溶解氧耗尽到介于约0.01μM和约1μM之间的浓度。在根据本公开的富集和/或检测微需氧微生物的方法的任何实施方案中,基本上耗尽培养基中的氧可包括将溶解氧耗尽到介于约0.1μM和约1μM之间的浓度。

[0056] 可使用本公开的方法、系统或试剂盒以有利于微需氧微生物的生长超过厌氧微生物的生长。因此,在根据本公开的富集和/或检测微需氧微生物的方法的任何实施方案中,基本上耗尽培养基中的氧可包括将溶解氧耗尽到介于约0.05μM和约100μM之间的浓度。在根据本公开的富集和/或检测微需氧微生物的方法的任何实施方案中,基本上耗尽培养基中的氧可包括将溶解氧耗尽到介于约0.01μM和约100μM之间的浓度。在根据本公开的富集和/或检测微需氧微生物的方法的任何实施方案中,基本上耗尽培养基中的氧可包括将溶解氧耗尽到介于约0.5μM和约100μM之间的浓度。在根据本公开的富集和/或检测微需氧微生物的方法的任何实施方案中,基本上耗尽培养基中的氧可包括将溶解氧耗尽到介于约1μM和约100μM之间的浓度。

[0057] 可使用本公开的方法、系统或试剂盒以有利于严格厌氧微生物的生长超过微需氧微生物的生长。因此,在根据本公开的富集和/或检测厌氧微生物的方法的任何实施方案中,基本上耗尽培养基中的氧可包括将溶解氧耗尽到约 $0.2\mu\text{M}$ 或更低的浓度。在根据本公开的富集和/或检测厌氧微生物的方法的任何实施方案中,基本上耗尽培养基中的氧可包括将溶解氧耗尽到约 $0.1\mu\text{M}$ 或更低的浓度。在根据本公开的富集和/或检测厌氧微生物的方法的任何实施方案中,基本上耗尽培养基中的氧可包括将溶解氧耗尽到约 $0.05\mu\text{M}$ 或更低的浓度。在根据本公开的富集和/或检测厌氧微生物的方法的任何实施方案中,基本上耗尽培养基中的氧可包括将溶解氧耗尽到约 $0.01\mu\text{M}$ 或更低的浓度。

[0058] 在本公开的方法或系统的任何实施方案中,术语“有效量”应被理解为意指实现氧清除效果有效的酶和/或酶底物的量,该氧清除效果将给定体积的含水介质中的溶解氧的浓度降低到一定程度,该程度允许微需氧微生物或厌氧微生物生长足够长的时间段,任选地有利于微生物的检测。

[0059] 用于氧清除体系中的酶的量可取决于多种因素,诸如样品体积、氧的初始浓度、给定环境中需要的氧的所需浓度(例如,以促进专性厌氧菌相对于微需氧微生物的生长)、清除的所需速率(例如,以使专性厌氧菌对潜在致死浓度的氧的暴露最小化)、氧进入的速率(例如,如果容器不透氧),以及所采用的酶的比活性。然而,在任何实施方案中,在使用本公开的方法形成含水混合物之后,酶可以至少1K单位/升(1000单位/升),或在一些情况下至少2K单位/升(2000单位/升),或在一些情况下至少3K单位/升(3000单位/升),或在一些情况下至少4K单位/升(4000单位/升)的量存在于混合物中。为了有利于迅速耗尽含水培养基中的溶解氧,在形成含水混合物之后,酶可以液体介质的总体积的至少4K单位/升的量存在于混合物中。

[0060] 用于氧清除体系中的酶底物的量也可影响从本公开的容器中的给定环境耗尽氧的速率、程度和持续时间。因此,在任何实施方案中,在使用本公开的方法形成含水混合物之后,存在于混合物中的底物可为约 $0.1\text{mg}/\text{ml}$ 至 $100\text{mg}/\text{ml}$ 。在任何实施方案中,本公开的含水混合物中的酶底物的浓度可为约 $0.1\text{mg}/\text{ml}$ 至 $50\text{mg}/\text{ml}$ 。在任何实施方案中,本公开的含水混合物中的酶底物的浓度可为约 $0.1\text{mg}/\text{ml}$ 至 $10\text{mg}/\text{ml}$ 。在任何实施方案中,本公开的含水混合物中的酶底物的浓度可为约 $0.1\text{mg}/\text{ml}$ 至 $5\text{mg}/\text{ml}$ 。本领域的技术人员将理解,底物的量可根据待实现的所需清除速率或待在给定体积的液体介质中获得的所需氧浓度而改变,这取决于待富集的靶微生物的性质。

[0061] 众所周知,酶催化功能是必需的,并且干酶不起作用。水合可促进催化功能和/或底物和产物的扩散。因此,按照本发明,酶底物系统在与足够的水分接触后被激活;并且在阈值水合水平之下,酶底物系统基本上失活。如本文所用,术语“氧清除体系”是指激活或失活的系统。因此,按照本发明,酶-底物系统可以各种形式配置,诸如片剂形式(丸、圈或小球)、冻干形式、小袋、容器内喷涂、可溶解或可降解的(例如,可在与含水溶液接触后降解的)袋或胶囊,或以粉状速溶介质。

[0062] 在任何实施方案中,可以设想到,本公开的系统的酶或酶底物可被配置为团聚的粉末。任选地,酶或酶底物可与培养基(例如,富集肉汤培养基)中的一种或多种营养物(例如,肉汤营养物或粉末状营养物)团聚,如PCT公布No.WO2014/025514中所公开;该公布以引用方式全文并入本文中。

[0063] 根据本发明的一个方面,酶和底物可在介质灭菌后掺入到液体介质中。按照另一方面,酶或酶-底物可与含有微生物的样品同时添加到介质中。在另一个实施方案中,酶-底物可在添加样品之后添加。在任何实施方案中,可将介质和样品添加到已被涂覆到容器的壳壁上的酶底物系统。

[0064] 本公开整体涉及用于在样品中培养和/或检测厌氧/微需氧微生物的方法。样品可从多种来源获得。在任何实施方案中,来源可为食品来源(例如,食品成分、进程中食品样品或成品食品样品)。在一些实施方案中,来源可为非食品来源。与用于检测厌氧/微需氧微生物的需要费力程序的常规方法相反,本发明的方法不费力地允许使用者仅仅根据本发明将样品与预定介质和氧清除体系结合以创建对于厌氧/微需氧微生物的富集和检测有益的条件。

[0065] 根据一个实施方案,待测试的样品可以包括提供疑似含有靶厌氧/微需氧微生物的样品。合适的样品的非限制性示例包括食品样品,即各种食品、饮料或者食品处理环境来源或饮料处理环境来源。此类食品来源的非限制性示例包括生的或经处理的水果或蔬菜、生的或经处理的肉类、非流体或基于流体的乳制品、糖浆、发酵饮料、饮用水、牛奶等。巴氏消毒的食品或饮料也可形成合适的来源。示例可包括但不限于肉类、家禽、蛋、鱼、海鲜、蔬菜、水果、预加工食品(如汤、调味汁、糊)、谷物产品(如面粉、谷类食品、面包)、罐装食品、奶、其他乳制品(如奶酪、酸奶、酸奶油)、脂肪、油类、甜点、调味品、香料、意大利面、饮料、水、动物饲料、其他合适的可食用材料以及它们的组合。

[0066] 术语“食品”是指固体或液体来源(例如,包括但不限于溶液、分散液、乳液、悬浮液等、以及它们的组合)和/或半固体可食用组合物。

[0067] 待用于本公开的方法中的合适样品还包括源自各种人类/动物来源的临床样品,诸如生理流体,例如,血液、唾液、滑液、脓、汗液、脑脊液、尿液、乳汁、渗出液、鼻腔样品、胆汁、骨髓、直接肺吸出物、来自正常无菌部位的组织活检、来自正常无菌部位(如关节)的流体、牙齿脓肿、腹部或盆腔脓肿,伤口(例如,创伤或手术伤口)、严重烧伤以及其他可能的感染组织等。在任何实施方案中,待测试的样品可包括生物组织和/或生物流体。

[0068] 待用于本公开的方法中的合适样品还包括环境样品(例如,环境水样品(例如,地表水、工艺用水)、土壤样品、表面残留物样品等)。

[0069] 各种采样技术可用于收集疑似含有靶厌氧和/或微需氧微生物的样品。此类采样技术同样适用于本发明的方法。测试样品(例如,液体)可在筛选前经受处理,例如,这可以包括浓缩、沉淀、过滤、离心、透析、稀释等。在任何实施方案中,样品的一个或多个各种稀释物可被制备并且稀释物中的每种可用作接种物。

[0070] 在另一方面,本公开提供用于还原和/或移除氧的方法,该方法包括:a) 提供容器以容纳疑似含有厌氧和/或微需氧微生物的靶样品;b) 提供氧清除体系,该氧清除体系包含:a) 有效量的氧化还原酶家族的酶,和b) 有效量的还原底物;以及c) 使容器的内容物与氧清除体系接触,由此氧被还原或者从密封容器移除,从而促进厌氧和/或微需氧微生物的富集和/或检测。在任何实施方案中,容器可为密封容器。有利的是,在氧清除体系被激活之后,密封容器允许较少的氧从环境气氛进入。

[0071] 在任何实施方案中,本发明提供用于培养厌氧和/或微需氧微生物的方法,所述方法包括在容器中形成含水混合物;该混合物包括含有厌氧微生物的样品、支持所述厌氧或

微需氧微生物的生长的预定体积的介质,以及氧清除体系;其中所述氧清除体系包含有效量的i) 氧化还原酶家族的酶以及ii) 所述酶的底物,其中所述氧清除体系在水合时被激活,从而创建基本上耗尽氧的含水环境;以及在有利于所述厌氧微生物的至少一种细胞分裂的条件下温育样品、介质和氧清除体系。在任何实施方案中,容器可为基本上不透氧的容器。在任何实施方案中,容器可为密封容器。有利的是,在氧清除体系被激活之后,密封容器允许较少的氧从环境气氛进入。

[0072] 根据另一个优选的实施方案,本公开提供了用于检测样品中的厌氧和/或微需氧微生物的方法。因此,本公开提供了检测样品中的厌氧和/或微需氧微生物的方法,该方法包括:在容器中接触预定体积的含水液体,该含水液体包括:疑似含有厌氧微生物的样品、支持所述厌氧和/或微需氧微生物的生长的介质,以及氧清除体系;其中所述氧清除体系包含氧化还原酶家族的酶以及所述酶的底物;其中所述氧清除体系在水合时被激活,从而创建基本上耗尽氧的含水环境;在有利于所述厌氧和/或微需氧微生物的至少一种细胞分裂的条件下温育样品、介质和氧清除体系;以及检测所述厌氧和/或微需氧微生物存在或不存在。在任何实施方案中,容器可为基本上不透氧的容器。在任何实施方案中,容器可为密封容器。有利的是,在氧清除体系被激活之后,密封容器允许较少的氧从环境气氛进入。

[0073] 因此,本公开提供用于培养微需氧和/或厌氧微生物[一种或多种]的系统,所述系统包含:有效量的i) 氧化还原酶家族的酶以及ii) 所述酶的底物,所述酶和底物在水合时被激活,从而创建没有氧或含有痕量的氧的环境;容器;以及预定体积的含水介质,该含水介质支持所述厌氧或微需氧微生物的生长。在任何实施方案中,容器可基本上不透氧。

[0074] 术语“容器”或“包装”是指形成限定被设计成保持任何类型的靶样品的内部空间的封装件的物体,并且该物体具有隔氧特性。术语“密封容器”和“密封包装”是指限定被设计成容纳含水介质、靶样品和氧清除体系的内部空间的容器,其中所述容器被设计成基本上防止与容器外存在的环境气氛的无阻挡连通。容器可为小袋、封套、密封包裹、袋、罐、瓶、桶、盒子或阻挡袋、拉链储存袋(例如,ZIPLOC储存袋)等,实验室搅拌袋(例如,STOMACHER袋)、带塞或隔膜的烧瓶、带塞或隔膜的瓶、或适于微生物培养物在含水介质中的容纳和生长的密封容器的任何形式。在任何实施方案中,容器可为可密封的,并且任选地为可重新密封的。

[0075] 容器可采取任何合适的形状或尺寸以用于保持和容纳预定体积的介质和/或疑似含有厌氧和/或微需氧微生物的样品。此外,容器可缺乏合适的营养介质,或者营养介质可包含在容器内。容器或包装可为单次使用、用后即弃类型的容器。作为另外一种选择,容器或包装可为可重复使用的。在任何实施方案中,容器可使用本领域已知的用于特定材料的方法来灭菌,容器由所述特定材料制成。

[0076] 在任何实施方案中,容器可由基本上不透氧的物质制成,使得氧通过容器的壳壁的流入基本上不超过氧清除体系将容器中的含水介质中的氧耗尽和/或维持到支持厌氧或微需氧微生物的生长的浓度的能力。

[0077] 在任何实施方案中,容器可包括可密封端口(例如,可穿通的自密封隔膜)以用于添加例如样品或试剂。除此之外或作为另外一种选择,可密封端口可用于移除材料(例如,本公开的含水混合物的一部分或全部、被引入到容器中的任何气体(例如,空气)的一部分或全部、和/或试剂(例如,本公开的酶或酶底物))。

[0078] 在任何实施方案中，容器可由聚合物材料制成。优选地，聚合物材料对于氧清除体系和密封容器的内容物为基本上惰性的。在任何实施方案中，聚合物材料可具有使其基本上不透氧的厚度和组成。合适的聚合物材料的非限制性示例包括聚氯乙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚偏二氯乙烯(PVdC)、乙烯乙酸乙烯酯共聚物、聚偏二氯乙烯共聚物、乙烯乙酸乙醇共聚物、聚酰胺(诸如尼龙6)、聚丙烯腈、聚甲基丙烯腈、乙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、二乙酸纤维素、Neoprene[®]、Teflon[®]、聚硅氧烷或它们的混合物或层合物。在任何实施方案中，容器可由玻璃制成。

[0079] 在任何实施方案中，容器可为多层聚合物膜层合物。在任何实施方案中，包括聚合物膜的容器可包括取向聚合物膜(例如，取向聚丙烯(OPP)、取向尼龙、取向聚对苯二甲酸乙二醇酯(OPET))。在任何实施方案中，包括聚合物膜的容器可包括金属化膜(例如，具有金属(例如，铝)涂层的聚合物膜)。在任何实施方案中，包括聚合物膜的容器可包括PVdC、PVdC共聚物或聚乙酸乙酯(PVOH)涂覆的膜(例如，PVOH涂覆的OPP、PVdC涂覆的OPET、PVdC共聚物涂覆的OPET、PVdC涂覆的OPP、PVdC共聚物涂覆的OPP)。

[0080] 容器的透氧性被容器的组成和厚度影响。在任何实施方案中，可能优选的是使用高度柔性的容器(例如，通过沿着至少一个边缘密封一个或多个聚合物膜而制造的袋)以便使储存空间最小化以及/或者适合各种不同尺寸或形状的空间以用于温育。作为另外一种选择，在任何实施方案中，可能优选的是使用相对刚性的容器(例如，玻璃瓶或管)。任何容器的透氧性可测量为氧通过容器的壳壁进入或外出的速率。单位被报告为纳摩尔/(米×秒×Gpa)。

[0081] 在任何实施方案中，容器的壳壁的透氧性可小于例如约100nmol/(m×s×Gpa)。在任何实施方案中，容器的壳壁的透氧性可小于或等于50nmol/(m×s×Gpa)，小于或等于25nmol/(m×s×Gpa)，小于或等于15nmol/(m×s×Gpa)，或小于或等于10nmol/(m×s×Gpa)。通过举例的方式，在任何实施方案中，容器可由厚度为约0.025mm且透氧性为约6-8nmol/(m×s×Gpa)的聚对苯二甲酸乙二醇酯膜构成。

[0082] 在任何实施方案中，容器可为密封的。虽然在一些实施方案中可能是优选的，但是容器中的残余空气无需在密封容器之前或之后完全移除。因此，在任何实施方案中，具有设置在其中的含水介质、样品和/或氧清除体系的密封容器可包括顶部空间。顶部空间可包括在容器密封时截留在容器中的气体(例如，环境空气)。优选地，顶部空间相对较小，以便不构成存在于密封容器中的氧的显著贮存器。在任何实施方案中，顶部空间体积可为约0毫升至约50毫升。在本公开的方法的任何实施方案中，顶部空间中的空气可被完全排出，至少部分地排出，或者其可根本不被移除。

[0083] 本发明提供用于检测样品中的厌氧微生物和/或微需氧微生物存在的方法。另外，相对于微需氧或厌氧微生物的浓度，样品可包含更高(例如，至少更高2倍、至少更高3倍、至少更高5倍、至少更高10倍、至少更高100倍、至少更高1000倍、至少更高10000倍、至少更高100000倍)浓度的需氧微生物。在待检测的微生物(即“靶微生物”)在样品中相对稀少或者实际上数量非常低的情况下，可能需要样品中的所述微生物的富集以便检测其。有利的是，本公开的方法促进包含微需氧微生物或厌氧微生物中的至少一种与需氧微生物的混合微生物群体中的厌氧或微需氧微生物的富集。

[0084] 可通过根据本公开的方法或系统检测到的典型厌氧细菌的非限制性示例包括拟

杆菌 (*Bacteroides*)、梭杆菌 (*Fusobacterium*)、卟啉单胞菌 (*Porphyromonas*)、普雷沃菌 (*Prevotella*)、放线菌 (*Actinomyces*)、双歧杆菌 (*Bifidobacterium*)、梭菌 (*Clostridium*)、消化链球菌 (*Peptostreptococcus*)、丙酸杆菌 (*Propionibacterium*)、乳杆菌 (*Lactobacillus*)、消化球菌 (*Peptococcus*)、消化链球菌和韦荣球菌 (*Veillonella*)。可易于通过本发明检测到的通常出现的食品污染厌氧细菌中的一些包括梭菌属的细菌,即产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、产孢梭菌 (*Clostridium sporogenes*)、肉毒梭菌 (*C. botulinum*)、和艰难梭菌 (*C. difficile*) ,其可引起食物中毒。

[0085] 本公开的方法或系统可用于检测和培养微需氧细菌。根据本发明的微需氧生物体的非限制性示例为弯曲杆菌 (*Campylobacter*) 属、包柔氏螺旋体 (*Borrelia*) 属和螺杆菌 (*Helicobacter*) 属。例如,本公开的方法或系统可用于检测空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*) 和大肠弯曲杆菌 (*Campylobacter coli*) ,其为引起食物中毒的两个主要菌种。弯曲杆菌属最常作为食品污染物出现,并且已知其在普通厌氧培养中生长不良。这些生物体通常以5-15%的量需要氧以供生长。

[0086] 在任何实施方案中,本公开的方法或系统可用于检测和培养兼性厌氧菌。可通过本发明检测到的典型兼性厌氧菌的非限制性示例包括选自葡萄球菌 (*Staphylococcus*) 属、链球菌 (*Streptococcus*) 属、埃希氏菌 (*Escherichia*) 属、李斯特菌 (*Listeria*) 属和希瓦氏菌 (*Shewanella*) 属的细菌。

[0087] 如本文所述,培养基可选自营养培养基、选择性培养基、富集的培养基和富集培养基。优选地,该介质特别适于厌氧菌和/或微需氧细菌的生长、分离和识别。用于培养靶厌氧和/或微需氧生物体的合适介质通常可包含以下物质中的一种或多种作为碳源:葡萄糖、果糖、半乳糖、蔗糖、乳糖、纤维二糖、麦芽糖、木糖、核糖、甘露糖、海藻糖、纤维二糖、阿拉伯糖、淀粉水解物或合适的碳水化合物源。合适的介质还可包括蛋白质材料或其组分(例如,一种或多种氨基酸、一种或多种寡肽)。蛋白质材料理想地以约2至25%之间的量引入,并且可包括任何合适的来源,诸如植物蛋白粉(例如,蛋白胨、大豆粉),或动物蛋白(例如,鱼粉、肝粉、肉粉)等。待引入到介质中的任选盐可选自碳酸钠、硫酸钾、氯化钙、氯化镁、硫酸亚铁、硫酸亚铁七水合物、硫酸镁或它们的混合物。水理想地以包含约25重量%至75重量%的量添加到固体营养物和底物的混合物中。富集培养基的非限制性示例包括例如博尔顿肉汤、亚硒酸盐肉汤和熟制肉汤。介质的pH可被调节到最佳范围以用于怀疑菌种的细菌的生长。介质可在添加氧清除体系和样品之前被灭菌。

[0088] 在本发明的任何实施方案中,将氧清除体系掺入到液体介质中可使得系统在添加样品的同时被激活,该样品中检测到厌氧菌或微需氧细菌的存在。该情况有利于氧清除反应的高效定时和持续以在液体介质中实现适当水平的厌氧生活。

[0089] 根据本发明,样品、介质和氧清除体系的温育可在有利于待富集和/或检测的厌氧和/或微需氧生物体的至少一种细胞分裂的最佳条件下进行。

[0090] 温育温度可根据待检测的微生物来选择。温育可在对于厌氧/微需氧细菌的生长有益的温度下进行,所述厌氧/微需氧细菌可能疑似存在于样品中。本领域的普通技术人员将根据疑似存在于靶样品中的微生物的性质来选择适当的温育温度(例如,约25°C、约30°C、约35°C、约37°C、约42°C)。因此,温育温度可取决于样品中的疑似细菌的最佳生长温度,例如弯曲杆菌属的最佳生长温度介于37和42°C之间,对于梭菌属为约37°C。对于人类病原

体微生物中的许多,温育的理想温度可为约37℃。

[0091] 温育的持续时间可根据待富集的微生物而改变。这一段时间可为预定的时间段。在一些实施方案中,温育含水混合物可包括温育混合物至少约1小时、至少约5小时、至少约8小时、至少约12小时、至少约18小时、至少约24小时、至少约48小时、或至少约72小时。在一些实施方案中,可将培养装置温育不超过约24小时、不超过约48小时或不超过约72小时。

[0092] 可以设想到,本公开的培养系统或方法可用于富集硫酸盐还原细菌。在这些实施方案中,可能期望温育含水混合物最多至约28天。

[0093] 虽然在本公开的方法中不需要,但温育含水混合物还可任选地包括通过搅拌来温育含水混合物(例如,容器可在温育期间使用本领域中已知的搅拌装置来搅拌)。作为另外一种选择,含水混合物可根据下文的实施例中所述的方法来温育而无需搅拌。

[0094] 有利的是,本公开的方法或系统提供了接种有含有厌氧/微需氧细菌的样品的介质在常规温育箱(即,具有周围(即,含氧)气体环境的温育箱)中的温育。使用根据本公开的方法避免对专用设备(如厌氧室)的需要。

[0095] 在任何实施方案中,本公开的方法任选地包括检测容器中的厌氧或微需氧微生物的生长的步骤。在任何实施方案中,检测厌氧或微需氧微生物的生长可包括观察生长(例如,目视或通过使用诸如nephthelometer或分光光度计之类的仪器)。观察可在温育步骤期间以及/或者在温育步骤之后进行。在任何实施方案中,厌氧菌和/或微需氧细菌的生长的观察可包括浊度的观察。通常,活细胞计数为大约 1×10^7 或更高的细菌悬浮液将具有可观察到的浊度。介质中观察到浊度可指示厌氧菌和/或微需氧细菌的富集已发生。微生物生长也可通过使用指示试剂并且测量指示剂中的可观察变化而检测到,诸如pH指示试剂或温育后介质中的显色或荧光酶底物。

[0096] 在任何实施方案中,根据本公开的方法还可包括分析厌氧微生物或微需氧微生物以使厌氧微生物或微需氧微生物与由除了其在含氧环境中生长的能力之外的特征表征的微生物的属、种或群相关联。分析微生物可使用本领域中已知的任何微生物分析方法来进行,包括但不限于生化方法(例如,检测与特定微生物或微生物的群相关联的酶活性或生物分子)、遗传方法(例如,核酸扩增、核酸杂交、PCR、核酸测序)、和/或免疫学方法(例如,蛋白质印迹、ELISA)。在任何实施方案中,可能希望检测与特定微生物或微生物的群相关联的代谢副产物或毒素。

[0097] 在任何实施方案中,方法还可包括使混合物与指示氧存在或不存在的材料接触。在任何实施方案中,使混合物与材料接触可包括使材料溶解或悬浮在混合物中。因此,在任何实施方案中,材料可为可溶于水的。作为另外一种选择,材料可为不可溶于水的并且可设置在例如不可溶于水的聚合物或涂层中。例如,材料可为可掺入到待测试的介质和/或样品中的任何合适的材料,其通过可逆或不可逆的颜色变化来指示给定环境中存在或不存在氧。因此,指示剂在存在氧的情况下可具有一种颜色,而在基本上耗尽和/或没有氧的气氛中具有不同颜色。另外,当氧不存在时指示剂可为无色的而当氧存在时显色,或者当氧存在时指示剂可为无色的而当几乎没有或没有氧存在于周围气氛中时显色。在任何实施方案中,指示剂可包括荧光指示试剂。合适的指示试剂包括但不限于在本领域中已知的氧敏感染料。

[0098] 可用于本公开的方法或系统中的水溶性可逆颜色指示剂的非限制性示例是亚甲

蓝。亚甲蓝在不存在氧的情况下是无色的,但在存在足够溶解氧的情况下,诸如在空气平衡含水液体中,其具有蓝颜色。在任何实施方案中,颜色指示材料可以是这样的一种材料,其经历可逆颜色变化以使得从含氧气氛到基本上耗尽和/或没有氧的气氛,或从没有氧的气氛到含氧气氛的任何变化都将通过颜色变化来指示。

[0099] 在任何实施方案中,在有利于至少一种细胞分裂的条件下温育混合物之后,方法可任选地包括对混合物中的微生物进行识别和/或计数。微生物可使用本领域中已知的任何合适的方法来识别(例如,生化鉴定、遗传鉴定、免疫学鉴定)。对混合物中的微生物进行计数可包括例如在生物体已在其富集中生长之后将其涂布在琼脂上并计数。在任何实施方案中,混合物或其部分可在识别或计数程序之前被纯化(例如,以移除可以其他方式干扰识别或计数程序的物质)和/或稀释。

[0100] 在又一方面,本公开提供用于厌氧微生物或微需氧微生物的富集、检测或两者的试剂盒。试剂盒包括可密封的容器;包括有效量的i) 氧化还原酶家族的酶以及ii) 所述酶的底物的氧清除体系;所述氧清除体系在与预定体积的含水介质水合时被激活,从而创建基本上耗尽或没有氧的环境。如果需要,试剂盒还可包括另外的组分,所述组分被选择以允许对于一种或多种特定应用使用试剂盒。在试剂盒的任何实施方案中,容器基本上不透氧。

[0101] 在本公开的试剂盒的任何实施方案中,容器可选自小袋、封套、密封包裹、袋、罐、瓶、桶、盒子或阻挡袋、拉链袋(例如,ZIPLOC储存袋)、致密实验室袋(例如,STOMACHER搅拌袋)、带塞烧瓶、带塞瓶、或适用于保持厌氧或微需氧微生物的培养物的任何形式的密封容器。在任何实施方案中,容器可使用塞子、隔膜(例如,可穿通的自密封隔膜)、螺丝帽和/或热封来密封。

[0102] 容器可由合适的聚合物材料形成,所述聚合物材料包括聚氯乙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚偏二氯乙烯、聚丙烯腈、聚乙烯乙酸乙烯酯共聚物、聚甲基丙烯腈、乙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、二乙酸纤维素、Neoprene[®]、Teflon[®]、聚硅氧烷或它们的混合物和/或层合物。在任何实施方案中,容器可由玻璃制成。

[0103] 按照本发明,试剂盒可包括以各种形式配置的酶-底物系统,诸如片剂形式(例如,丸、圈或小球)、冻干形式、袋内喷涂、小袋,或粉状速溶介质。

[0104] 在任何实施方案中,试剂盒还可包括另外的组分,诸如选自pH指示剂、用于指示氧存在或不存在的指示剂中的至少一种指示剂,使用说明书,或上述另外组分中任意两种或更多种的组合。

[0105] 示例性实施方案

[0106] 实施方案A是方法,所述方法包括:

[0107] 在容器中形成含水混合物;该混合物包括含有厌氧微生物或微需氧微生物的样品,支持厌氧微生物或微需氧微生物的生长的预定体积的介质,以及氧清除体系;

[0108] 其中所述氧清除体系包含有效量的i) 氧化还原酶家族的酶以及ii) 所述酶的底物;

[0109] 其中所述氧清除体系在水合时被激活,从而将介质中的溶解氧耗尽到有利于厌氧微生物或微需氧微生物的生长的浓度;以及

[0110] 在有利于所述厌氧微生物或微需氧微生物的至少一种细胞分裂的条件下温育含水混合物。

- [0111] 实施方案B是方法,所述方法包括:
- [0112] 在容器中形成含水混合物;该混合物包括含有厌氧微生物或微需氧微生物的样品,支持厌氧微生物或微需氧微生物的生长的预定体积的介质,以及氧清除体系;
- [0113] 其中所述氧清除体系包含有效量的i) 氧化还原酶家族的酶以及ii) 所述酶的底物;
- [0114] 其中所述氧清除体系在水合时被激活,从而将介质中的溶解氧耗尽到有利于厌氧微生物或微需氧微生物的生长的浓度;
- [0115] 其中酶选自抗坏血酸氧化酶和漆酶;以及
- [0116] 在有利于所述厌氧微生物或微需氧微生物的至少一种细胞分裂的条件下温育含水混合物。
- [0117] 实施方案C是实施方案A或实施方案B的方法,其中将介质中的溶解氧耗尽到有利于厌氧微生物或微需氧微生物的生长的浓度包括将介质中的溶解氧耗尽到约100μM或更低的浓度。
- [0118] 实施方案D是实施方案A或实施方案B的方法,其中将介质中的溶解氧耗尽到有利于厌氧微生物或微需氧微生物的生长的浓度包括将介质中的溶解氧耗尽到约10μM或更低的浓度。
- [0119] 实施方案E是实施方案A或实施方案B的方法,其中将介质中的溶解氧耗尽到有利于厌氧微生物或微需氧微生物的生长的浓度包括将介质中的溶解氧耗尽到约1μM或更低的浓度。
- [0120] 实施方案F是前述实施方案中任一项的方法,所述方法还包括:
- [0121] 检测厌氧微生物或微需氧微生物的生长。
- [0122] 实施方案G是实施方案F的方法,所述方法还包括:
- [0123] 分析厌氧微生物或微需氧微生物以使厌氧微生物或微需氧微生物与由除了其在含氧环境中生长的能力之外的特征表征的微生物的属、种或群相关联。
- [0124] 实施方案H是前述实施方案中任一项的方法,其中在容器中形成含水混合物包括在基本上不透氧的容器中形成含水混合物。
- [0125] 实施方案I是前述实施方案中任一项的方法,其中酶包括抗坏血酸盐氧化酶,其中底物选自:抗坏血酸或其盐、抗坏血酸的衍生物或其盐、对苯二酚、连苯三酚、邻苯二酚,或前述底物的任两种或更多种的混合物。
- [0126] 实施方案J是实施方案I的方法,其中抗坏血酸的衍生物选自D-异抗坏血酸盐、D-阿拉伯糖型抗坏血酸、6-氨基-L-抗坏血酸盐、6-脱氧-1-抗坏血酸盐、D-赤型抗坏血酸盐、6-邻苯基-L-抗坏血酸盐、和6-S-苯基1-L-抗坏血酸盐。
- [0127] 实施方案K是实施方案A至H中任一项的方法,其中酶包括漆酶,其中底物选自酚、L-酪氨酸、邻联苯酚和对联苯酚、2,6-二甲氧基苯酚,以及前述底物的任两种或更多种的混合物。
- [0128] 实施方案L是前述实施方案中任一项的方法,其中所述方法促进包含微需氧微生物或厌氧微生物中的至少一种与需氧微生物的混合微生物群体中的厌氧或微需氧微生物的富集。
- [0129] 实施方案M是前述实施方案中任一项的方法,其中在形成含水混合物之后,酶以至

少1000单位/升的浓度存在于混合物中。

[0130] 实实施方案N是实施方案M的方法,其中在形成含水混合物之后,酶以至少2000单位/升的浓度存在于混合物中。

[0131] 实实施方案O是实施方案M的方法,其中在形成含水混合物之后,酶以至少4000单位/升的浓度存在于混合物中。

[0132] 实实施方案P是前述实施方案中任一项的方法,其中在形成含水混合物之后,底物以约0.1mg/ml至100mg/ml的浓度存在于混合物中。

[0133] 实实施方案Q是实施方案P的方法,其中在形成含水混合物之后,底物以约0.1mg/ml至50mg/ml的浓度存在于混合物中。

[0134] 实实施方案R是实施方案P的方法,其中在形成含水混合物之后,底物以约0.1mg/ml至10mg/ml的浓度存在于混合物中。

[0135] 实实施方案S是实施方案P的方法,其中在形成含水混合物之后,底物以约0.1mg/ml至5mg/ml的浓度存在于混合物中。

[0136] 实实施方案T是前述实施方案中任一项的方法,其中在形成含水混合物之前,氧清除体系的至少一部分被配置为溶液、片剂、小袋、设置在容器的壳壁的内侧表面上的涂层、或粉末。

[0137] 实实施方案U是前述实施方案中任一项的方法,形成含水混合物包括使氧清除体系和样品的混合物与介质接触。

[0138] 实实施方案V是前述实施方案中任一项的方法,其中形成含水混合物包括使氧清除体系与包含样品和介质的含水液体混合物接触。

[0139] 实实施方案W是前述实施方案中任一项的方法,其中样品包括从选自空气、水、食品、饮料、动物、生物组织、生物流体和环境表面的来源收集的材料。

[0140] 实实施方案X是前述实施方案中任一项的方法,其中厌氧微生物是专性厌氧菌或兼性厌氧菌。

[0141] 实实施方案Y是前述实施方案中任一项的方法,其中微生物属于选自拟杆菌、梭杆菌、卟啉单胞菌、普雷沃菌、放线菌、双歧杆菌、梭菌、消化链球菌、丙酸杆菌、乳杆菌、消化球菌、消化链球菌、韦荣球菌、葡萄球菌、链球菌、埃希氏菌、李斯特菌和希瓦氏菌的属。

[0142] 实实施方案Z是前述实施方案中任一项的方法,其中微需氧微生物属于选自弯曲杆菌、螺杆菌和包柔氏螺旋体的属。

[0143] 实实施方案AA是实施方案Z的方法,其中弯曲杆菌属的微需氧微生物属于选自空肠弯曲杆菌和大肠弯曲杆菌的菌种。

[0144] 实实施方案AB是前述实施方案中任一项的方法,其中容器由聚合物材料制成。

[0145] 实实施方案AC是实施方案AB的方法,其中聚合物材料选自聚氯乙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚偏二氯乙烯、聚乙二烯共聚物、聚丙烯腈、聚甲基丙烯腈、乙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、二乙酸纤维素、Neoprene[®]、Teflon[®]、聚硅氧烷以及它们的混合物和层合物。

[0146] 实实施方案AD是实施方案F至AC中任一项的方法,其中检测微生物的生长包括在温育后测量或检测介质的可观察变化。

[0147] 实实施方案AE是实施方案AD的方法,其中测量或检测介质的可观察变化包括测量或观察浊度。

- [0148] 实施方案AF是实施方案AD的方法,其中使用指示剂来检测厌氧或微需氧微生物的生长。
- [0149] 实施方案AG是前述实施方案中任一项的方法,所述方法还包括:
- [0150] 将指示氧存在或不存在的材料放置到容器中。
- [0151] 实施方案AH是实施方案AG的方法,其中将材料放置到容器中包括将材料放置成与介质流体连通。
- [0152] 实施方案AI是实施方案AG或实施方案AH的方法,其中材料通过颜色变化指示容器中存在或不存在氧。
- [0153] 实施方案AJ是实施方案AG至AI中任一项的方法,其中所述材料为亚甲蓝。
- [0154] 实施方案AK是前述实施方案中任一项的方法,其中将介质中的溶解氧耗尽到有利于所述生长的浓度包括将溶解氧在约60分钟或更短时间内耗尽到该浓度。
- [0155] 实施方案AL是前述实施方案中任一项的方法,其中将介质中的溶解氧耗尽到有利于所述生长的浓度包括将溶解氧在约30分钟或更短时间内耗尽到该浓度。
- [0156] 实施方案AM是用于培养微需氧微生物或厌氧微生物的培养系统,所述系统包含:
- [0157] 有效量的i) 氧化还原酶家族的酶以及ii) 所述酶的底物;
- [0158] 容器;以及
- [0159] 支持所述厌氧或微需氧微生物的生长的预定体积的含水介质;
- [0160] 其中有效量有效地使预定体积中的溶解氧耗尽到有利于微需氧微生物或专性厌氧微生物的生长的浓度。
- [0161] 实施方案AN是用于培养微需氧微生物或厌氧微生物的培养系统,所述系统包含:
- [0162] 有效量的i) 氧化还原酶家族的酶以及ii) 所述酶的底物,其中酶选自抗坏血酸氧化酶和漆酶;
- [0163] 容器;以及
- [0164] 支持所述厌氧或微需氧微生物的生长的预定体积的含水介质;
- [0165] 其中有效量有效地使预定体积中的溶解氧耗尽到有利于微需氧微生物或专性厌氧微生物的生长的浓度。
- [0166] 实施方案AO是实施方案AM或实施方案AN的培养系统,其中容器基本上不透氧。
- [0167] 实施方案AP是实施方案AM至AO中任一项的培养系统,其中容器是可密封的。
- [0168] 实施方案AQ是实施方案AP的培养系统,其中容器是可密封的。
- [0169] 实施方案AR是实施方案AM至AQ中任一项的培养系统,其中有效量有效地使预定体积中的溶解氧耗尽到约100μM或更少。
- [0170] 实施方案AS是实施方案AM至AQ中任一项的培养系统,其中有效量有效地使预定体积中的溶解氧耗尽到约10μM或更少。
- [0171] 实施方案AT是实施方案AM至AQ中任一项的培养系统,其中有效量有效地使预定体积中的溶解氧耗尽到约1μM或更少。
- [0172] 实施方案AU是实施方案AM至AT中任一项的培养系统,其中有效量有效地使预定体积中的溶解氧在约60分钟或更短的时间内耗尽到有利于所述生长的浓度。
- [0173] 实施方案AV是实施方案AM至实施方案AT中任一项的培养系统,其中有效量有效地使预定体积中的溶解氧在约30分钟或更短的时间内耗尽到有利于所述生长的浓度。

- [0174] 实施方案AW是试剂盒,所述试剂盒包括:
- [0175] 可密封的容器;以及
- [0176] 包括i) 氧化还原酶家族的酶以及ii) 所述酶的底物的氧清除体系。
- [0177] 实施方案AX是试剂盒,所述试剂盒包括:
- [0178] 可密封的容器;以及
- [0179] 包括i) 氧化还原酶家族的酶以及ii) 所述酶的底物的氧清除体系,其中酶选自抗坏血酸氧化酶和漆酶。
- [0180] 实施方案AY是实施方案AW或实施方案AX的试剂盒,其中容器基本上不透氧。
- [0181] 实施方案AZ是实施方案AW至AY中任一项的试剂盒,其中可密封的容器是可重新密封的。
- [0182] 实施方案BA是实施方案AW至AZ中任一项的试剂盒,其中酶分配在一个或多个第一器皿中,每个第一器皿具有有效地与酶底物反应的量的酶以使预定体积的含水介质中的溶解氧耗尽到有利于厌氧微生物或微需氧微生物的生长的溶解氧浓度。
- [0183] 实施方案BB是实施方案AW至BA中任一项的试剂盒,其中底物分配在一个或多个第一器皿或者一个或多个第二器皿中,每个第一器皿或第二器皿具有有效地与酶反应的量的底物以使预定体积的含水介质中的溶解氧耗尽到有利于厌氧微生物或微需氧微生物的生长的溶解氧浓度。
- [0184] 实施方案BC是实施方案BA或实施方案BB的试剂盒,其中第一器皿和/或第二器皿是容器。
- [0185] 实施方案BD是实施方案AW至BC中任一项的试剂盒,其中容器选自小袋、封套、密封包裹、袋、罐、瓶、桶、烧瓶和瓶子。
- [0186] 实施方案BE是实施方案AW至BD中任一项的试剂盒,其中容器由聚合物材料制成,所述聚合物材料选自聚氯乙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚偏二氯乙烯、聚丙烯腈、聚甲基丙烯腈、乙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、二乙酸纤维素、Neoprene[®]、Teflon[®]、聚硅氧烷以及它们的混合物。
- [0187] 实施方案BF是实施方案AW至BD中任一项的试剂盒,其中容器由玻璃制成。
- [0188] 实施方案BG是实施方案AW至BF中任一项的试剂盒,其中酶和/或底物以选自片剂、小袋、设置在容器的壳壁的内侧表面上的涂层、或粉末的形式设置在试剂盒中。
- [0189] 实施方案BH是实施方案AW至BG中任一项的试剂盒,其中试剂盒还包括可放置到容器中以指示容器中存在或不存在氧的材料。
- [0190] 实施方案BI是实施方案BH的试剂盒,其中材料通过颜色变化指示容器中存在或不存在氧。
- [0191] 实施方案BJ是实施方案BH或实施方案BI的试剂盒,其中材料包括亚甲蓝。
- [0192] 实施方案BK是实施方案AW至BJ中任一项的试剂盒,其中试剂盒还包括pH指示剂。
- [0193] 实施方案BL是实施方案AW至BK中任一项的试剂盒,其中试剂盒还包括使用说明书。
- [0194] 提供以下实施例以更好地说明所要求保护的发明,而不以任何方式解释为限制本发明的范围。下文所述的所有特定材料和方法全部或部分地落入本发明的范围内。这些特定组成、材料和方法并不旨在限制本发明,而是仅仅说明落入本发明的范围内的特定实施

方案。本领域的技术人员可以在没有实施本发明的能力以及不脱离本发明范围的情况下开发等同的材料和方法。应当理解,可在本文所述的程序中进行许多变型形式同时仍保持在本发明的界限内。本发明人意图将此类变型形式涵盖在本发明的范围内。

[0195] 实施例

[0196] 实施例1-显示微需氧和厌氧微生物的富集和检测:

[0197] 生物体:空肠弯曲杆菌/大肠弯曲杆菌和产孢梭菌

[0198] 使用的培养基:博尔顿肉汤(富集培养基)

[0199] 表1博:尔顿肉汤的组成

浓度	组分	组分的来源
10g/L	肉蛋白胨	Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ (新泽西州富兰克林湖的贝克顿-迪金森公司)
5g/L	乳白蛋白	部件号 L3065; Spectrum Chemicals; New Brunswick, NJ (新泽西州新不伦瑞克的光谱化学公司)
5g/L	酵母提取物	CAS# 8013-01-2; EMD Millipore; Billerica, MA (马萨诸塞州比尔里卡的 EMD 密理博公司)
5g/L	氯化钠	CAS# 7647-14-5; US Biochemical Corporation; Cleveland, OH (俄亥俄州克利夫兰的美国生物化学公司)
1.0g/L	α -酮戊二酸	CAS# 328-50-7; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO (密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司)
0.5g/L	丙酮酸钠	CAS# 113-24-6; 西格玛奥德里奇公司
0.6g/L	碳酸钠	CAS 号 497-19-8; 西格玛奥德里奇公司;
0.01g/L	氯高铁血红素	西格玛奥德里奇公司
0.15g/L	硫酸亚铁七水合物	CAS# 7782-63-0; 西格玛奥德里奇公司

[0201] 将肉汤的组分溶解于去离子水中并且将混合物高压消毒。在灭菌之后,将大约 225mL 的肉汤分配到保持 500mL 液体体积的阻挡袋(Associated Bag Company, Milwaukee, WI (威斯康辛州密尔沃基的相关袋公司), 部件号 185-100) 中。

[0202] 在去离子水中制备抗坏血酸氧化酶(部件号 061A0500; Calzyme Laboratories;

San Luis Obispo, CA (加利福尼亚州圣路易斯奥比斯波的Calzyme实验室)) 和抗坏血酸钠 (CAS#134-03-2; 西格玛奥德里奇公司) 的储备溶液。

[0203] 微需氧生物体的富集和检测:空肠弯曲杆菌/大肠弯曲杆菌:

[0204] 将样品 (空肠弯曲杆菌/大肠弯曲杆菌在巴特菲尔德氏缓冲液中的稀释过夜培养物) 添加到介质的每个袋以在培养基中达到约50CFU(约0.002CFU/10 μ L)的最终浓度。使用拉链型密封在每个袋的开口处将袋密封。随后,向袋中的培养基补充适当体积的储备溶液以在培养基中达到4K单位/升的酶(抗坏血酸盐氧化酶)和1.31mg/mL的底物(抗坏血酸钠)的最终浓度。每个密封袋具有用介质密封在袋中的30-100mL环境空气。将密封袋在环境气氛中在42°C下温育48小时。另一个袋如上制备并温育,但是不掺杂样品微生物并且用作对试剂和袋的无菌对照物。未接种的对照物不可见浑浊,这表明不存在由于来自组分或袋的污染而导致的生长。用弯曲杆菌接种的袋也不浑浊,这表明微生物没有生长到大于约10⁷/mL的细胞浓度。然后将来自弯曲杆菌富集培养物和对照介质中的每个的接种环(大约10微升)划线接种到非选择性炭琼脂上并且将板温育过夜。在用弯曲杆菌富集培养物样品接种的板上观察到生长(即,>100个菌落/板),这确认了微需氧细菌在富集培养物中创建的贫氧环境中生长。在由对照介质接种的板上未观察到生长。

[0205] 专性厌氧细菌(例如,产孢梭菌)的富集和检测

[0206] 将样品 (产孢梭菌在巴特菲尔德氏缓冲液中的稀释过夜培养物) 添加到介质的袋以在培养基中达到约50CFU的最终浓度。随后,向袋中的培养基补充适当体积的储备溶液以在培养基中达到4K单位/升的酶(抗坏血酸盐氧化酶)和6.55mg/mL的底物(抗坏血酸钠)的最终浓度。如上所述制备对照袋(没有细菌)。使用压力密封在每个袋的开口处将袋密封。每个密封袋具有用介质密封在袋中的30-100mL环境空气。将密封袋在环境气氛中在37°C下温育48小时。生长由用产孢梭菌接种的袋中的可见浊度指示。未接种的对照物不可见浑浊,这表明不存在由于来自组分或袋的污染而导致的生长。

[0207] 本文引用的所有专利、专利申请和专利公开的全部公开内容以及可供使用的电子版材料均以引用方式并入。在本专利申请的公开内容和以引用方式并入本文的任何文献的公开内容之间存在任何矛盾的情况下,应以本专利申请的公开内容为准。上述具体实施方式和实施例仅为清楚理解本发明而给出。所述具体实施方式和实施例不应被理解为不必要的限制。本发明不限于示出的和描述的具体细节,对本领域的技术人员而言显而易见的变形形式将包括在由权利要求书所限定的本发明中。

[0208] 所有的标题是为了阅读者方便,而不应该用于限制该标题后面的正文的含义,除非如此规定。

[0209] 在不脱离本发明的实质和范围的前提下,可进行各种修改。这些以及其他实施方案均在如下权利要求书的范围内。