



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107532120 A

(43)申请公布日 2018.01.02

(21)申请号 201680024503.X

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

(22)申请日 2016.04.26

代理人 陈长会 吕小羽

(30)优先权数据

62/154,684 2015.04.29 US

(51)Int.Cl.

G12M 1/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.10.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/029318 2016.04.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/176183 EN 2016.11.03

(71)申请人 3M创新有限公司

地址 美国明尼苏达州

(72)发明人 E·D·布鲁蒂内尔

M·B·福雷斯特 J·W·比约克

A·J·斯坦纳斯

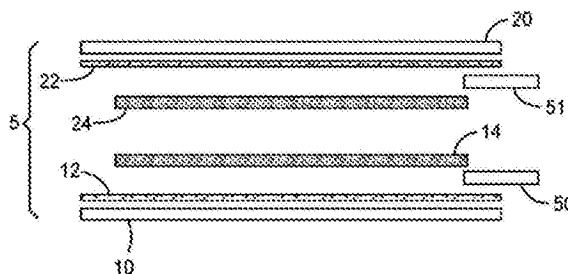
权利要求书2页 说明书32页 附图11页

(54)发明名称

独立成套的产生无氧环境的培养装置

(57)摘要

本发明提供用于培养厌氧微生物的装置。所述装置包括主体，所述主体包括防水基部、附接到所述基部的防水覆盖片、以及设置在所述基部和所述覆盖片之间的生长隔室。所述生长隔室具有周边和提供通向所述生长隔室的液体通道的开口。所述周边的一部分由防水密封件限定。所述部分包括所述周边的>50%。干燥的冷水溶性胶凝剂在所述生长隔室中附着到所述基部。干燥的第一除氧试剂设置在所述生长隔室中。



1. 一种装置,所述装置包括:

主体,所述主体包括防水基部、附接到所述基部的防水覆盖片、和设置在所述防水基部和所述防水覆盖片之间的生长隔室,所述生长隔室具有周边和提供通向所述生长隔室的液体通道的开口;

其中所述周边的一部分由防水密封件限定,其中所述部分包括所述周边的>50%;

干燥的冷水溶性胶凝剂,所述干燥的冷水溶性胶凝剂在所述生长隔室中附着到所述基部;以及

干燥的第一除氧试剂,所述干燥的第一除氧试剂设置在所述生长隔室中。

2. 根据权利要求1所述的培养装置,所述培养装置还包括设置在所述生长隔室中的有效量的干燥的产生二氧化碳的试剂。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的培养装置,其中所述产生二氧化碳的试剂基本上由直径为100微米或更小的颗粒组成。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,所述装置还包括设置在所述生长隔室中的干燥还原剂。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,所述装置还包括干燥营养素,其中所述营养素设置在所述生长隔室中,其中所述营养素有利于厌氧微生物的生长,其中所述营养素不是所述除氧试剂。

6. 根据权利要求5所述的装置,其中所述营养素包含不可发酵的有机碳源。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,所述装置还包括设置在所述生长隔室中的干燥的第二除氧试剂。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,所述装置还包括用于检测活的微生物存在的指示试剂,其中所述指示试剂设置在所述生长隔室中。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,其中第一干燥组分附着到所述基部,所述第一干燥组分选自所述第一除氧试剂、所述第二除氧试剂、所述还原试剂、所述营养素、所述指示试剂和前述组分中任两种或更多种的组合。

10. 根据权利要求9所述的装置,其中所述基部包括在所述生长隔室的至少一部分中设置在所述基部上的第一粘合剂层,其中所述第一干燥组分在所述生长隔室中附着到所述第一粘合剂层。

11. 根据权利要求9所述的装置,所述装置还包括第一载体,其中所述第一干燥组分附着到所述第一载体,其中所述第一载体在所述生长隔室中附着到所述第一粘合剂层。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,其中第二干燥组分附着到所述覆盖片,所述第二干燥组分选自所述第一除氧试剂、所述第二除氧试剂、所述还原试剂、所述营养素、所述指示试剂和前述组分中任两种或更多种的组合。

13. 根据权利要求12所述的装置,

其中所述覆盖片包括在所述生长隔室的至少一部分中设置在所述覆盖片上的第三粘合剂层;

其中所述第二干燥组分在所述生长隔室中附着到所述第三粘合剂层。

14. 根据权利要求12所述的装置,所述装置还包括第二载体,其中所述第二干燥组分附着到第二载体,其中所述第二载体在所述生长隔室中附着到所述第二粘合剂层。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述第一平面防水基底还包括靠近所述开口的第一可移除凸块。

16. 根据权利要求15所述的装置,其中所述第一可移除凸块包括与其附着的第一闭合粘合剂。

17. 根据权利要求16所述的装置,所述装置还包括可剥离地附着到所述第一闭合粘合剂的第一离型衬件。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述覆盖片还包括靠近所述开口的第二可移除凸块。

19. 根据权利要求18所述的装置,其中所述第二可移除凸块包括与其附着的第二闭合粘合剂。

20. 根据权利要求19所述的装置,所述装置还包括可剥离地附着到所述第二闭合粘合剂的第二离型衬件。

独立成套的产生无氧环境的培养装置

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求提交于2015年4月29日的美国临时专利申请62/154,684的优先权,该临时专利申请的公开内容全文以引用方式并入本文。

背景技术

[0003] 许多细菌对氧气敏感,并且在存在氧气的情况下不会生长。确定此类厌氧微生物在多种环境中的生存力可为有用的。例如,确定食品加工和/或包装设施中是否存在厌氧微生物可为重要的。确定医疗环境中是否存在厌氧微生物,例如,利用诊断分析法确定是否存在病原体也可为重要的。又如,水处理设施检测水样,确定是否存在此类微生物。

[0004] 现有多种装置可用来培养微生物。例如,长期以来用皮氏培养皿培养微生物。如本领域已知,皮氏培养皿是底部浅而平的圆形培养皿,其中盛装支持微生物生长的适宜培养基,诸如琼脂和营养素。然而,使用琼脂培养基可为不方便的,且耗费时间。例如,在添加样品前,必须先将琼脂培养基灭菌、融化,再冷却。

[0005] 另外,使用皮氏培养皿可难以提供适宜培养厌氧微生物的环境。由于厌氧微生物在存在氧气的情况下无法大量生长,因此可需要繁琐的理化工艺来促使此类微生物生长。通常必须改造此类装置,也就是说,必须将其成形或构造成能够提供阻止氧气透过的物理屏障。

[0006] 现已开发出使用掺入厌氧培养装置的化学试剂除去氧气的其它技术。此类装置通常包括掺入凝胶或营养培养基的还原剂或细菌无菌膜碎片。另外,美国专利3,338,794描述了一种厌氧细菌培养装置,该装置由不透氧的膜层与位于膜之间的营养培养基构成,其中营养培养基包含还原化合物。

[0007] 然而,这些装置和其它装置可能造价高昂,也许不适合用后即丢弃。这些装置的组装和/或使用也可能是繁琐的。尽管本领域已尝试生产在有氧环境中培养厌氧微生物的简易装置,但仍需要改善的厌氧培养装置。

发明内容

[0008] 一般来讲,本公开涉及检测样品中的微生物,任选地对样品中的微生物进行计数。具体地讲,本公开涉及微耐氧微生物、微需氧微生物、专性厌氧微生物的生长和检测。生长和检测可使用独立成套的产生改性环境的培养装置来进行。产生改性环境的装置用含水液体激活以产生具有降低的溶解氧浓度和任选地增加的溶解二氧化碳浓度的含水生长培养基。

[0009] 本文公开的本发明的培养装置和方法甚至在含氧(如含正常的大气氧)环境中温育微生物的同时,支持微耐氧微生物、微需氧微生物或专性厌氧微生物的生长、检测和区分。有利的是,这省去对培养厌氧微生物通常需要的专门温育设备和试剂(例如厌氧菌罐、一次性厌氧菌袋、钯催化剂、厌氧手套箱)的需要。另外,本发明的方法允许检测各单独菌落产生的二氧化碳气体,由此支持对细菌进行区分,从而省去了分离纯培养物所需的额外温

育时间、还避免了使用发酵管来检测气体产量。此外,本公开涉及对样品中的微耐氧微生物、微耐氧微生物、专性厌氧微生物或嗜二氧化碳微生物进行计数。微需氧微生物和专性厌氧微生物具有共同的特征,即,它们需要在低氧环境中生长和繁殖。

[0010] 在一个方面,本公开提供用于对微生物的菌落进行计数的培养装置。该装置可包括主体,该主体包括防水基部、附接到该基部的防水覆盖片、以及设置在基部和覆盖片之间的生长隔室。生长隔室可具有周边和提供通向生长隔室的液体通道的开口。周边的一部分由防水密封件限定。该部分可包括周边的>50%。干燥的冷水溶性胶凝剂可在生长隔室中附着到基部。干燥的第一除氧试剂可设置在生长隔室中。

[0011] 在另一个方面,本公开提供用于培养厌氧微生物的装置。该装置可包括主体,该主体包括平面防水基底、冷水溶性胶凝剂和干燥的第一除氧试剂。基底可包括周边边缘、包括隔开的第一部分和第二部分的第一主表面、与第一主表面相背对的第二主表面、以及相对于第二部分重叠并置放置第一部分的折叠件。第一部分和第二部分可限定生长隔室的内壁,该生长隔室包括周边和提供通向生长隔室的液体通道的开口。周边的一部分由防水密封件限定,其中该部分可包括周边的>50%。冷水溶性胶凝剂可在生长隔室中附着到第一部分。干燥的第一除氧试剂可设置在微生物生长隔室中。

[0012] 在又一方面,本公开提供检测样品中的厌氧微生物的方法。该方法可包括将样品沉积到根据前述实施方案中任一个所述的装置的生长隔室中,在有利于厌氧微生物生长的条件下温育装置,以及检测生长隔室中厌氧微生物菌落的指示。

[0013] 词语“优选的”和“优选地”指在某些情况下可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它情况下,其它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它实施方案是不可用的,并且并非旨在将其它实施方案排除在本发明范围之外。

[0014] 术语“包括/包含”及其变型形式在说明书和权利要求中出现这些术语的地方不具有限制的含义。

[0015] 如本文所用,“一个”、“一种”、“所述(该)”、“至少一个(种)”以及“一个(种)或多个(种)”可互换使用。因此,举例来说,一种营养素可被解释为是指“一种或多种”营养素。

[0016] 术语“和/或”意指所列要素中的一个或全部,或者所列要素中的任两个或更多个的组合。

[0017] 另外,在本文中,通过端点表述的数值范围包括该范围内包含的所有数值(例如,1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等)。

[0018] 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生物,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。

[0019] 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任何生物体。厌氧微生物包括专性厌氧菌和兼性厌氧菌两者。专性厌氧菌是在暴露于大气水平的氧时将死亡的那些微生物。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

到发酵或厌氧呼吸的生物体。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。

[0020] 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。微需氧细菌使用氧气,但只有非常低的浓度(低微摩尔级范围),通常氧浓度含量水平为5%至15%,其生长受正常氧浓度或大于约15%的浓度的抑制。

[0021] 如本文所用,术语微生物的“培养”或“生长”是指通过使微生物体在预先确定的培养基中在对于其生长有益的条件下来使其倍增的方法。更具体地,其为提供合适的培养基和条件以有利于微生物的至少一个细胞分裂的方法。培养基是含有微生物生长所需的所有营养素和必需物理生长参数的固体、半固体或液体介质。

[0022] 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。富集培养的环境将积极地影响所选微生物的生长,和/或消极地影响其它微生物的生长。

[0023] “除氧试剂”和“氧清除剂”将被广义地用于本文以表示可消耗、耗尽或与来自给定环境的氧反应的化合物。优选地,除氧试剂不减缓或抑制厌氧微生物的生长。

[0024] 术语“还原试剂”是指能够降低通过本公开装置的生长隔室中的干燥组分的水合而形成的半固体培养基的 E_h 势能的物质。

[0025] 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。以下的描述更具体地举例说明例示性实施方案。在本申请全文的若干处,通过实施例列表提供了指导,这些实施例可以各种组合使用。在每种情况下,所引用的列表都只用作代表性的组,并且不应理解为排它性列表。

[0026] 将结合下面的附图和说明书介绍上述及其它实施方案的更多细节。通过说明书、附图和权利要求书,其它特征、目的和优点将变得显而易见。

附图说明

[0027] 图1A为根据本公开的培养装置的一个实施方案的平面图。

[0028] 图1B为图1A的培养装置沿线1B-1B的分解横截面侧视图。

[0029] 图2A为根据本公开的培养装置的另选实施方案的平面图。

[0030] 图2B为图2A的培养装置的分解侧视图。

[0031] 图3为根据本公开的培养装置的又一个另选实施方案的平面图。

[0032] 图4A为图3的培养装置的另选实施方案的平面图。

[0033] 图4B为图4A的培养装置的分解侧视图。

[0034] 图5A为根据本公开的培养装置的又一个另选实施方案的平面图。

[0035] 图5B为图5A的培养装置的分解侧视图。

[0036] 图6为根据本公开的包括一体基部的部分装配的培养装置的平面图。

[0037] 图7是图6的部分装配的培养装置的侧视图。

[0038] 图8是被折叠以形成培养装置的图6的部分装配的培养装置的侧视图。

[0039] 图9为由图6的部分装配的培养装置形成的培养装置的平面图。

[0040] 图10为用于接种本公开的培养装置的方法的一个实施方案的示意性平面图。

[0041] 图11A-图11E为用于制备根据本公开的培养装置的方法的一个实施方案的各种步

骤的示意性平面图。

具体实施方式

[0042] 在详细解释本公开的任何实施方案之前,应当了解,本发明在其应用中不限于下文描述中所提及或下文附图中所示出的构造的细节和部件的布置方式。本发明能够具有其它实施方案,并且能够以各种方式实践或进行。另外,应当理解,本文使用的措词和术语是用于说明目的而不应被视为限制性的。本文使用的“包括”、“包含”或“具有”及其变型形式意在涵盖其后列出的项目及其等同形式以及附加的项目。除非另外说明或限定,否则术语“连接”和“联接”及其变型形式以广义的方式使用并且既涵盖直接的和联接又涵盖间接的连接和联接。此外,“连接”和“联接”不限于物理或机械连接或联接。应当理解,可采用其它的实施方案,并且可在不脱离本公开的范围的情况下作出结构变化或逻辑变化。此外,诸如“前”、“后”、“顶部”、“底部”等术语仅用于当元件彼此相关的时候描述元件,而决非意在陈述设备的具体取向,以指示或暗示设备的必要或所需取向,或指定在使用中将如何使用、安装、显示或定位本文所述发明。

[0043] 本公开整体涉及检测样品中的微生物,任选地对样品中的微生物进行计数。例如,在一些实施方案中,本公开涉及不同组的微需氧微生物、微耐氧微生物或专性厌氧微生物的生长和检测。不同组包括统称为乳酸菌(以下称为“LAB”)的亚组。现在已知,可使用独立成套的产生低氧环境的培养装置进行微需氧微生物、微耐氧微生物或专性厌氧微生物的生长和检测。

[0044] 某些微生物被认为是兼性厌氧微生物。因此,它们可在存在或不存在氧气的情况下生长。这些微生物以及专性厌氧微生物可通过在低氧或无氧环境中培养它们而相对于严格需氧微生物进行选择性地富集。本公开的装置可有利地用于选择性地富集存在于还含有严格需氧微生物的样品中的兼性厌氧微生物和专性厌氧微生物。

[0045] 目前还已知,可制得干燥、可再水合的独立成套的产生低氧环境的培养装置。培养装置包括设置在培养装置的生长隔室中的有效量的基本上干燥的除氧试剂并且能够在预先确定的体积的含水溶液中再水合,其中在再水合时,除氧试剂能够参与耗氧反应。此外,目前已知,耗氧反应可消耗足量的氧气,从而有利于微耐氧微生物、微需氧微生物或专性厌氧微生物的生长。此外,可在温育期间将该培养装置保持在有氧环境中,在该有氧环境中,培养装置可维持低氧环境至多约八天,从而有利于前述微生物的生长。

[0046] 可以分析可源自任何来源的试验样品中的所关注菌种,所述任何来源诸如:生理流体(例如血液、唾液、晶状体液、滑膜液、脑脊液、脓汁、汗液、渗出物、尿液、黏液)、黏膜组织(例如口腔黏膜、齿龈黏膜、鼻黏膜、眼黏膜、气管黏膜、支气管黏膜、胃肠黏膜、直肠黏膜、尿道黏膜、输尿管黏膜、阴道黏膜、子宫颈黏膜、以及子宫粘膜)、哺乳期乳汁、粪便等。另外,试验样品可源自身体部位,例如伤口、皮肤、前鼻孔、鼻咽腔、鼻腔、鼻前庭、头皮、指/趾甲、外耳、中耳、口、直肠、阴道、腋窝、会阴、肛门,或其它类似的部位。

[0047] 除了生理流体外,其它试验样品可包含其它液体以及溶解或悬浮于液体介质中的一种或多种固体。所关注的样品可包括工艺物流、水、食品、食品成分、饮料、土壤、植株或其它植被、空气、表面(例如制造工厂、医院、诊所或住宅里的墙壁、地板、设备、用具),等等。

[0048] 需要在氧张力降低的环境中生长的细菌(即微需氧细菌)和/或耐受氧张力降低的

环境且可在其中生长的细菌(即耐氧细菌)的非限制性示例包括幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、弯曲菌属(*Campylobacter*)菌种(例如,空肠弯曲菌(*C. jejuni*)、大肠弯曲菌(*C. coli*)、胎儿弯曲菌(*C. fetus*))、中间链球菌(*Streptococcus intermedius*)、血链球菌(*Streptococcus sanguis*)、星座链球菌(*Streptococcus constellatus*)、麻疹孪生球菌(*Gemella morbillorum*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)菌种、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)。

[0049] 厌氧细菌在自然界中普遍存在。厌氧细菌可以是专性厌氧的,或另选地可以是兼性厌氧的。专性厌氧细菌或兼性厌氧细菌的非限制性示例包括硫酸盐还原细菌(SRB;例如诸如脱硫弧菌属(*Desulfovibrio* spp.)和脱硫肠状菌属(*Desulfotomaculum* spp.))、产酸菌(APB;例如诸如醋酸杆菌属(*Acetobacterium*)、片球菌属(*Pediococcus*)、嗜蛋白菌属(*Proteiniphilum*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、热球菌属(*Thermococoides*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*))、放线菌属(*Actinomyces*)菌种、梭菌属(*Clostridium*)菌种(例如,产气荚膜梭菌(*C. perfringens*)、破伤风梭菌(*C. tetani*)、产芽孢梭菌(*C. sporogenes*)、肉毒杆菌(*C. botulinum*)、艰难梭菌(*C. difficile*)、丁酸梭菌(*C. butyricum*)、丙酮丁醇梭菌(*C. acetobutylicum*))、乳酸菌(例如,乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)菌种、明串珠菌属(*Leuconostoc*)菌种、片球菌属(*Pediococcus*)菌种、乳球菌属(*Lactococcus*)菌种)、拟杆菌属(*Bacteroides*)菌种(例如,脆弱拟杆菌(*B. fragilis*))和消化链球菌属(*Peptostreptococcus*)菌种(例如,微小消化链球菌(*P. micros*)、大消化链球菌(*P. magnus*)、不解糖消化链球菌(*P. asaccharolyticus*)、厌氧消化链球菌(*P. anaerobius*)和四链消化链球菌(*P. tetradius*))。兼性厌氧细菌的非限制性示例包括肠细菌(*Enterobacteria*) (例如大肠杆菌(*E. coli*))、沙门氏菌属(*Salmonella*)菌种、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、和李斯特菌属(*Listeria*)菌种(例如单核细胞增多性李斯特菌(*L. monocytogenes*))。

[0050] 因为很多酵母菌种是兼性厌氧的,并且一些酵母菌种是专性厌氧的,因此预期本公开的独立成套的产生无氧环境的培养装置也可用于酵母微生物的生长和检测。

[0051] 在一个方面,本公开提供用于培养并检测在低氧环境中生长的微生物的培养装置。参考图1A和图1B,本公开的培养装置100包括主体5,主体5包括防水基部10、防水覆盖片20、以及设置在基部10和覆盖片20之间的生长隔室30。基部10具有内表面和与内表面相背对的外表面。覆盖片20具有内表面和与内表面相背对的外表面。在任一实施方案中,基部10的内表面与覆盖片20的内表面以面向的关系设置。

[0052] 生长隔室30具有包括开口34的周边32。开口34提供通向生长隔室30的液体通道。周边的一部分由防水密封件40限定。在任一实施方案中,该部分包括生长隔室30的周边32的 $>50\%$ 。在任一实施方案中,该部分包括生长隔室30的周边32的 $\geq 80\%$ 。在任一实施方案中,该部分包括生长隔室30的周边32的 $\geq 90\%$ 。在任一实施方案中,该部分包括生长隔室30的周边32的 $\geq 95\%$ 。在任一实施方案中,该部分包括生长隔室30的周边32的 $\geq 98\%$ 。在任一实施方案中,该部分包括生长隔室30的周边32的 $\geq 99\%$ 。在任一实施方案中(例如,在装置被接种之后的使用期间,该部分包括生长隔室30的周边32的 100% 。

[0053] 基部10优选地为相对刚性的防水膜,其由不吸水,或者说是受水不利影响的材料(例如聚酯、聚丙烯或聚苯乙烯)制成。基部10优选地使用基本上不可透过气态氧的材料

制成。基部10的合适材料的非限制性示例包括至少约15 μm 至至少约180 μm 厚的聚酯膜、至少约100 μm 至至少约200 μm 厚的聚丙烯膜以及至少约300 μm 至约380 μm 厚的聚苯乙烯膜。其它合适的基部包含乙烯-乙醇共聚物膜、聚乙烯醇膜、以及聚偏二氯乙烯膜。基部10可以是不透明的、半透明的、或者如果期望透过基部10观察菌落,则基部可以是透明的。

[0054] 覆盖片20附接(例如,粘着地附接)到基部10以限定生长隔室30;并且任选地,如果覆盖片是可传输光的;以在装运、存储、温育、和/或菌落计数期间观察生长隔室。覆盖片20优选地为相对刚性的防水膜,其由不吸水,或者说不受水不利影响的材料(例如聚酯、聚丙烯或聚苯乙烯)制成。覆盖片20优选地是透明的,以有利于在不打开培养装置10的情况下对菌落进行计数,并且基本上不可渗透微生物和水蒸气。

[0055] 一般来讲,覆盖片可由诸如用于制备基部10的那些材料制成。覆盖片20优选地使用基本上不可透过气态氧的材料制成。基部10的合适材料的非限制性示例包括至少约15 μm 至至少约180 μm 厚的聚酯膜、至少约100 μm 至至少约200 μm 厚的聚丙烯膜以及至少约300 μm 至约380 μm 厚的聚苯乙烯膜。其它合适的基部包含乙烯-乙醇共聚物膜、聚乙烯醇膜、以及聚偏二氯乙烯膜。如图1中所示,覆盖片20经由防水密封件40粘结到基部10,防水密封件40沿生长隔室30的周边32的一部分延伸。

[0056] 本领域中具有普通技术的人员将认识到,可通过增大聚合物膜的厚度,来降低氧气穿透给定类型聚合物膜。在任一实施方案中,本公开的基部和覆盖片是具有基本上不可透过气态氧的合适厚度的聚合物膜。

[0057] 生长隔室30可位于培养装置100中的介于基部10和覆盖片20之间的任何可触及的位置。优选地,生长隔室30的周边32,除了开口34以外,与装置100的周边边缘80间隔开。

[0058] 本公开的装置包括在生长隔室30中附着到基部10的干燥的冷水溶性胶凝剂。优选地,胶凝剂直接或间接地附着到基部10。任选地,胶凝剂直接或间接地附着到装置100的覆盖片20。在任一实施方案中,胶凝剂可在装置100的生长隔室30中均匀地分布到基部10的内表面10和/或覆盖片20的内表面20上。

[0059] 在任一实施方案中,胶凝剂可在装置中作为附着到基部10的第一干燥涂层14提供。在任一实施方案中,第一干燥涂层14在生长隔室30中可附着到第一粘合剂层12,第一粘合剂层12附着到基部10。第一干燥涂层14中使用的合适胶凝剂包括冷水溶性天然胶凝剂以及合成胶凝剂。天然胶凝剂(诸如藻胶、羧甲基纤维素、塔拉胶、羟乙基纤维素、瓜尔胶、刺槐豆胶、黄原胶)与合成胶凝剂(诸如聚丙烯酰胺、聚氨酯、聚环氧乙烷)及其混合物一般是合适的。可依据本公开的教导内容和美国专利4,565,783、5,089,413和5,232,838的公开内容选择适用的胶凝剂。优选的胶凝剂包括瓜尔胶、刺槐豆胶、和黄原胶;这些胶凝剂可单独使用,或优选地可彼此组合使用。

[0060] 因此,在任一实施方案中,本公开的装置100任选地可包括在生长隔室30中附着到基部10的至少一部分或所有内表面10的第一干燥涂层14。第一干燥涂层14,如果存在,可包括干燥的冷水溶性胶凝剂。任选地,第一粘合剂层12附着到基部10并且第一干燥涂层的至少一部分在生长隔室30中附着到第一粘合剂层。

[0061] 覆盖片20可不含任何涂层(未示出)。另选地,如果装置100不具有在生长隔室30中附着到基部10的内表面10的第一干燥涂层14或者如果装置100不具有附着到基部10的第一干燥涂层14,那么覆盖片20可包括在生长隔室中与其附着的第二干燥涂层24。第二干燥涂

层24,如果存在,可包括干燥的冷水溶性胶凝剂。任选地,第二粘合剂层22附着到覆盖片20并且第二干燥涂层24的至少一部分在生长隔室30中附着到第二粘合剂层。在任一实施方案中,第二粘合剂层22的一部分可在生长隔室30的周边32处用于形成防水密封件。

[0062] 关于第一干燥涂层和第二干燥涂层,涂层任选地可包含任一种营养素或营养培养基,该营养素或营养培养基可用冷水重构,基本上不妨碍除氧试剂(下文论述)或胶凝剂的冷水胶凝性质,并且支持厌氧微生物的生长。适用于培养装置的一种或多种特定的营养素取决于将在该装置中生长的微生物,并且将由本领域的技术人员轻松地选择出来。一般来讲,此类营养素是冷水溶性的。用于支持细菌生长的合适营养素是本领域已知的,并且包括但不限于酵母提取物、蛋白胨、糖类、合适的盐,等等。在任一实施方案中,第一干燥涂层和/或第二干燥涂层还可包含选择剂(例如营养素、抗生素及其组合),特定厌氧微生物或微生物群相比另外的微生物或微生物群,其生长受该选择剂促进的程度更强。本领域的技术人员将会认识到,可使用多种其它配方,并且这些配方不减损本发明的范围。

[0063] 优选地,当第一干燥涂层14主要由干燥粉末或干燥粉末的团聚体组成时,将第一涂层14设置在第一粘合剂层12上,该粘合剂层设置在基部10的内表面的至少一部分上。可使用(例如)美国专利4,565,783、5,089,413和5,232,838中所述的配混方法、粘合剂涂覆方法、以及液体涂覆方法和/或干涂方法,将第一干燥涂层14沉积到基部10上,或沉积到任选的第一粘合剂层12上,前述专利均全文以引用方式并入本文。

[0064] 优选地,当第二干燥涂层24主要由干燥粉末或干燥粉末的团聚体组成时,将第二涂层24设置在第二粘合剂层22上,该粘合剂层设置在覆盖片20的内表面的至少一部分上。可使用(例如)美国专利4,565,783、5,089,413和5,232,838中所述的配混方法、粘合剂涂覆方法、以及液体涂覆方法和/或干涂方法,将第二干燥涂层24沉积到覆盖片20上,或沉积到任选的第二粘合剂层22上,前述专利均全文以引用方式并入本文。

[0065] 生长隔室30被限定为设置在介于基部10的内表面和覆盖片20的内表面之间的体积,该体积包括第一干燥涂层14和/或第二干燥涂层24的至少一部分。因此,当含水液体分布到生长隔室中时,含水液体便与第一干燥涂层14(如果存在)和/或第二干燥涂层24(如果存在)的至少一部分发生流体接触。在任一实施方案中,未接种的培养装置的生长隔室30的厚度可为约0.2mm至约3mm。本公开的接种的培养装置的生长隔室30的厚度可根据例如沉积在培养装置中的含水液体的体积(未示出)和与样品(未示出)相关联的固体的存在(例如,悬浮颗粒和/或膜过滤器)而变化。在任一实施方案中,接种的培养装置的生长隔室的厚度可为约1mm至约5mm。

[0066] 本公开的培养装置还包括有效量的一种或多种干燥除氧试剂。一种或多种除氧试剂设置在生长隔室中;任选地,在生长隔室中附着到粘合剂层,如本文所论述。“干燥”,如本文所用,是指试剂基本上不含水。短语“基本上不含水”是指一旦其已被允许与周围环境平衡,就具有不大于约材料(例如,作为粉末或作为脱水的含水涂层提供)的水含量的水含量的试剂。

[0067] 任选地,本公开的培养装置还可包括其它干燥的可再水合的组分诸如缓冲液、还原剂、指示试剂,和/或有效量的产生二氧化碳的试剂的组分。

[0068] 在将样品材料引入(例如,接种)培养装置的生长隔室中之前、期间、或之后,至少两种干燥的组分(例如,胶凝剂和一种或多种除氧试剂或还原剂)与含水液体水合,如本文

所述。通常,样品材料和/或含水液体在环境条件(即,有氧气体环境)下被引入培养装置的生长隔室中。因此,在有氧条件下用样品接种生长隔室后,培养装置的生长隔室中的含水液体包含第一溶解氧浓度。培养装置中的一种或多种除氧试剂起到将生长隔室中含水液体中的第一溶解氧浓度降至基本上低于第一溶解氧浓度的第二溶解氧浓度的作用。接种过的培养装置的生长隔室中的溶解氧浓度的降低,有利于专性厌氧微生物或微需氧微生物在培养装置中生长。

[0069] 在任一实施方案中,选择一种或多种除氧试剂的有效量及其浓度,使得在将一种或多种除氧试剂与培养装置的生长隔室中预定体积的含水液体发生流体接触后,第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度在约120分钟内发生。在任一实施方案中,选择一种或多种除氧试剂的有效量及其浓度,使得在将除氧试剂与培养装置的生长隔室中预定体积的含水液体发生流体接触后,第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度在约60分钟内发生。在任一实施方案中,选择一种或多种除氧试剂的有效量及其浓度,使得在将除氧试剂与培养装置的生长隔室中预定体积的含水液体发生流体接触后,第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度在约30分钟内发生。

[0070] 在任一实施方案中,在介于环境温度(例如约23°C)和约42°C之间(包括端值)的温度下,将第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度。因此,在根据本公开的方法的任一实施方案中,在使除氧试剂与培养装置的生长隔室中预定体积的含水液体发生流体接触后,为了将第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度,无需在升高的温度(即,高于环境温度)温育培养装置。

[0071] 本领域中具有普通技术的人员将认识到,在适于培养微生物的一段时间内,从本公开培养装置的生长隔室去除的氧量尤其取决于培养装置的生长隔室中的一种或多种除氧试剂的量。通过调节根据本公开的生长隔室中的除氧试剂的量,培养装置可被配置用于培养微耐氧微生物或用于培养专性厌氧微生物。

[0072] 许多除氧试剂是已知的,包括例如,L-抗坏血酸及其盐、催化耗氧反应的酶、亚铁盐、亚硫酸盐的金属盐、亚硫酸氢盐、和偏亚硫酸氢盐。根据本公开的合适的除氧试剂消耗足够的氧以在培养装置中产生低氧或厌氧的局部环境并且产生可与装置中待培养的微生物流体连通而不显著地抑制那些微生物生长的反应产物的量和类型。在任一实施方案中,除氧试剂以约 $1\mu\text{mol}/10\text{cm}^2$ 至约 $15\mu\text{mol}/10\text{cm}^2$ 的量设置在生长隔室中。

[0073] 优选地,在任一实施方案中,一种或多种除氧试剂以干燥粉末的形式提供。更优选地,在任一实施方案中,一种或多种除氧试剂作为干燥粉末提供,干燥粉末被研磨和分类以形成一组具有基本上由具有100微米或更小的直径的颗粒组成的粒度分布的颗粒。有利地,在具有100微米或更小的直径的颗粒中提供的除氧试剂可以有效量附着到基部或覆盖片(例如,附着到涂覆到基部或覆盖片上的粘合剂层)以在装置接种有预定体积的含水液体时在生长隔室中产生并维持(例如,温育至多约24小时,温育至多约48小时,温育至多约72小时,温育至多4天,温育至多5天,温育至多7天,温育至少24小时,温育至少48小时,温育至少72小时,温育至少4天,温育至少5天,温育至少7天)无氧环境,并且任选地,开口是密封的。

[0074] 用于设置在覆盖片20上的任选的粘合剂层22中的粘合剂可与用于设置在基部10上的任选的粘合剂层12中的粘合剂相同或不同。此外,设置在覆盖片20上的第二干燥涂层24可与设置在基部10上的第一干燥涂层14相同或不同。覆盖片20上的涂层可覆盖面向基部

的整个表面,但优选至少覆盖内表面的限定培养装置100的生长隔室30的至少一部分的部分。

[0075] 在任一实施方案中,选择剂可在装置中设置在干燥涂层中,或任选地,溶解在生长隔室内的粘合剂层中。

[0076] 本公开的培养装置任选地还包括用于指示培养装置中的氧的构件。该构件优选地能够指示装置中存在的氧量(例如,预先确定的阈值量或相对量)。有利地,该构件可指示是否或何时除氧试剂已适当地耗尽培养装置的生长隔室中的氧至有利于微需氧微生物、微耐氧微生物或专性厌氧微生物生长的浓度。用于检测培养装置中的氧的构件是本领域已知的,并且包括(例如)氧化还原型染料(例如亚甲蓝)和氧淬灭的荧光染料。

[0077] 这种构件可以是指示装置内侧是否存在氧的发光化合物。美国专利6,689,438(Kennedy等人)中公开了合适的氧气指示剂,该专利全文以引用方式并入本文。适合用作本公开培养装置中的指示剂的发光化合物将显示被氧淬灭的荧光。更确切地说,指示剂在暴露于它们的激发频率时将发光,发光强度与氧浓度成反比。这种指示剂可被涂覆、层合或挤压到所述装置内的另一层上,或另一层的一部分上。此类层可设置在生长隔室中,并且任选地通过一个或多个其它的透氧层与生长隔室分隔开。用于指示氧的合适化合物包含八乙基卟啉、四苯基卟啉、四苯并卟啉、二氢卟吩或细菌卟吩的金属衍生物。其它合适的化合物包含粪卟啉钯(PdCPP)、八乙基卟啉铂和八乙基卟啉钯(PtOEP、PdOEP)、四苯基卟啉铂和四苯基卟啉钯(PtTPP、PdTPP)、樟脑醌(CQ)和氧杂蒽类染料(诸如赤藓红B(EB))。其它合适的化合物包含钌、铱和铈与配体的配合物,配体诸如2,2'-二吡啶、1,10-邻二氮菲、4,7-二苯基-1,10-邻二氮菲,等等。这些配合物的合适示例包括三(4,7-二苯基-1,10-邻二氮菲)钌(II)高氯酸盐、三(2,2'-二吡啶)钌(II)高氯酸盐、三(1,10-邻二氮菲)钌(II)高氯酸盐,等等。

[0078] 本公开的培养装置任选地包括有效量的设置在生长隔室中的干燥的产生二氧化碳的试剂。不受理论的束缚,产生二氧化碳的试剂在通过与生长隔室中的含水液体接触而活化时建立以下溶解物质的平衡:碳酸盐、碳酸和二氧化碳中的一种或多种盐。优选地,有效量的产生二氧化碳的试剂足以将溶解的二氧化碳升高至有利于各种微生物生长的浓度。

[0079] 优选地,在任一实施方案中,产生二氧化碳的试剂以干燥粉末的形式提供。更优选地,在任一实施方案中,产生二氧化碳的试剂以干燥粉末提供,干燥粉末被研磨和分类以形成一组具有基本上由具有100微米或更小的直径的颗粒组成的粒度分布的颗粒。优选地,直径为100微米或更小的颗粒可以这样的量附着到基部或覆盖片(例如,附着到涂覆在基部或覆盖片上的粘合剂层),该量能有效地使在装置接种预定体积的含水液体并封闭后在生长隔室中若干天的温育时期内创建和维持富集CO₂的环境。在任一实施方案中,产生二氧化碳的试剂可附着到粘合剂层,该粘合剂层在生长隔室中附着到基部和/或覆盖片。

[0080] 本公开的培养装置任选地包括设置在生长隔室中的干燥的缓冲试剂,当与去离子水水合时,该缓冲试剂使水达到适于培养基培养并且任选地选择性地使某些微生物组富集的预定pH。例如,在任一实施方案中,预定pH可为约5.2至约7.8。在任一实施方案中,预定pH可少于或等于6.35(例如,约4.5至约6.35)。这种微酸性pH提供若干优点:i)相对于可存在于样品中的其它微生物,酸性环境选择性地有利于耐酸微生物(例如,LAB)生长,以及ii)酸性环境可使产生碳的试剂(如果存在)的平衡朝着更高比例的溶解CO₂偏移。这两个优点都更有利于例如LAB在培养装置中的生长。

[0081] 用于本公开的装置中的缓冲试剂包括具有约8.0或更少pKa的任何微生物相容的缓冲液。缓冲试剂的酸性或碱性部分以某一比率存在于培养装置中,该比率使得当预定体积的去离子水与缓冲试剂接触时,生长隔室中的pH适于特定微生物或微生物组的生长和检测。合适的缓冲试剂包含例如,磷酸金属盐、醋酸金属盐、2-(N-吗啉基)乙磺酸和2-(N-吗啉基)乙磺酸钠,以及琥珀酸和琥珀酸钠。本领域中具有普通技术的人员将认识到,可调节酸性缓冲试剂和碱性缓冲试剂的比率以便实现期望的含水混合物pH,含水混合物在预先确定的体积的含水液体(例如,包括样品)沉积在生长隔室中且装置闭合时形成。

[0082] 本公开的培养装置任选地包含指示试剂。合适的指示试剂(例如,氯化三苯基四氮唑(TTC))可检测存在于培养装置中的基本上所有的微生物。任选地,指示试剂可为差示指示剂;即,指示试剂将某些微生物与其它微生物区别开来。合适的指示试剂包括例如pH指示剂、氧化还原指示剂、显色酶底物和荧光酶底物,用于检测某种微生物的存在。指示剂不应显著地干扰除氧试剂。在任一实施方案中,指示试剂在装置中可设置在干燥涂层中,或任选地溶解于生长隔室内的粘合剂层中。

[0083] 本公开的培养装置任选地包括还原剂而不是干燥的除氧试剂,或除了干燥的除氧试剂之外还包括还原剂。合适的还原试剂可用于降低生长介质的氧化还原电势,并且从而有利于厌氧微生物的生长。合适的还原剂包括例如,巯基乙酸钠、L-半胱氨酸、二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇、以及它们的组合。

[0084] 在任一实施方案中,生长隔室的尺寸可被设定为与1ml含水液体体积水合。每毫升水包含约0.54 μ 摩尔溶解氧。因此,第一干燥涂层和/或第二干燥涂层优选地至少包含足够的除氧试剂,所述除氧试剂在约22°C至约42°C的温度,在120分钟或少于120分钟的一段时间内消耗0.54 μ 摩尔的氧。更优选地,第一干燥涂层和/或第二干燥涂层优选地至少包含足够的除氧试剂,所述除氧试剂在约22°C至约42°C的温度,在120分钟或少于120分钟的一段时间内消耗多于0.54 μ 摩尔的氧。在任一实施方案中,生长隔室的尺寸可被设定成容纳约2毫升至约10毫升的含水液体体积并与约2毫升至约10毫升的含水液体体积水合。本领域中具有普通技术的人员将认识到,附加量的除氧试剂在那些情况下需要消耗含水样品中的氧。

[0085] 在任一实施方案中,第一干燥涂层和/或第二干燥涂层可包含任何量的其它组分,诸如染料(例如pH指示剂)、交联剂、试剂(例如选择试剂或指示试剂,诸如显色酶底物或荧光酶底物),或者前述组分中任两种或更多种的组合。例如,就一些用途来说,需要将微生物生长指示剂(例如pH指示剂、显色酶底物、氧化还原型染料)掺入第一干燥涂层和/或第二干燥涂层,或掺入第一干燥涂层和/或第二干燥涂层与之附着的粘合剂。合适的染料包括由生长的微生物代谢的那些染料,或与生长的微生物以其它方式反应,因而引起菌落着色或发荧光(使菌落更容易显现)的那些染料。此类染料包括氯化三苯基四唑、对甲苯基四唑红、四唑紫、藜芦基四唑蓝及相关染料,以及5-溴-4-氯吡啶磷酸二钠盐。其它合适的染料包括对微生物生长过程中的pH值变化敏感的那些染料,诸如中性红。

[0086] 至少一个干燥涂层可任选地包含执行某些微生物测试所必需的试剂。例如,可包含抗生素,用于执行抗生素敏感性测试。就微生物鉴定来说,可包含在存在特定类型微生物时经历变色的差别化试剂。

[0087] 可使用多种技术制备本发明的培养装置。一般来讲,装置可手工制造,也可利用本

文所述以及例如美国专利4,565,783、5,089,413和5,232,838中描述的常见实验室设备制造。

[0088] 可用于第一粘合剂层和/或第二粘合剂层中的合适压敏粘合剂的非限制性示例为丙烯酸2-甲基丁酯/丙烯酸以90/10摩尔比的共聚物。可使用的其它优选压敏粘合剂包括以95/5或94/6摩尔比的丙烯酸异辛酯/丙烯酸,以及硅橡胶。暴露于水时变成乳状(例如不透明)的粘合剂是次优选的,但可结合不透明的基部使用,或者在不要求菌落显现的情况下使用。还已知热活化粘合剂和/或水活化粘合剂(诸如黏胶),热活化粘合剂中的熔点较低物质被涂覆在熔点较高物质上,这两种粘合剂都可用于本发明。在掺入上述指示试剂以便有利于菌落显现时,通常优选的是将指示试剂掺入粘合剂或肉汤涂料混合物而非粉末中。

[0089] 将第一粘合剂层或第二粘合剂层涂覆(例如,使用刮刀涂布机)到基部或覆盖片的顶部表面上以形成粘合剂层,该粘合剂层具有优选地小于待粘附至粘合剂的干燥粉末或团聚粉末的平均粒径的厚度。一般来讲,为了将颗粒粘附至基底(例如,本文所述的第一或覆盖片),但不过多而使颗粒变得完全嵌入粘合剂中,涂覆足够量的粘合剂。一般来讲,约5 μm 至约12 μm 厚的粘合剂层是合适的。

[0090] 优选的是,当第一干燥涂层和/或第二干燥涂层包含胶凝剂时,包含的胶凝剂的量使得被放入生长隔室的预先确定量的水或含水样品(例如1ml至3ml或更多)将形成粘度合适的水凝胶,该粘度(例如)在25 $^{\circ}\text{C}$ 用Brookfield L VF型粘度计以60rpm测量时,为约1500cps或更大。这种粘度的水凝胶使便于在温育期间处理并堆叠培养装置,并且这种粘度的水凝胶支持培养基中形成清晰的菌落。例如,将0.025g至0.050g粉末状瓜尔胶在20.3 cm^2 的表面积上基本上均匀地铺展开后,在用1ml至3ml含水样本重构时,这些粉末状瓜尔胶将提供足够粘稠的培养基。可使用粉末颗粒的尺寸来控制每单位面积的涂层重量。例如,在100目瓜尔胶涂层达到约0.05g/20.3 cm^2 的重量的条件下,400目瓜尔胶涂层达到约0.025g/20.3 cm^2 的重量。

[0091] 在任一实施方案中,第一干燥涂层或第二干燥涂层可包含一种或多种营养素,以有利于微生物生长。当所述涂层基本上由粉末或粉末团聚体组成时,附着粉末培养基中胶凝剂与营养素的优选比率由将在装置生长的特定微生物决定。然而,就一般目的而言,优选约4:1至约5:1的比率(胶凝剂总量比营养素总量,基于重量计)。可采用任何适用于基本上均匀地施加层的方式,将附着的粉末培养基中的粉末施加到粘合剂层(例如,第一粘合剂层12和/或第二粘合剂层22)上。施加粉末层的合适方法的示例包括使用振动式装置或使用粉末涂布机。

[0092] 本领域中具有普通技术的人员将认识到,用于本公开装置中的合适的营养素用于特定微需氧微生物、微耐氧微生物或专性厌氧微生物的生长和检测。合适的营养素的非限制性示例包括蛋白胨源(例如,肉汁、肉蛋白胨)、酵母提取物、酪蛋白的酶消化、和碳水化合物(例如,麦芽糖、葡萄糖、海藻糖、蔗糖)。在任一实施方案中,碳水化合物可为由某些微生物发酵成葡萄糖的营养素。优选地,碳水化合物以足够高以有利于微生物生长(生物质制备)的量存在于装置中并且任选地由微生物发酵以形成可检测量的 CO_2 ,该 CO_2 可作为邻近微生物菌落的气泡被检测。

[0093] 当使用本公开的培养装置时,可希望对存在的微生物的菌落进行准确计数。因此,在任一实施方案中,本公开的培养装置可在基部下或另外地在覆盖片上包括网格图案。此

网格图案可包括方形网格图案,诸如例如,美国专利4,565,783中公开的方形网格图案。该网格图案可通过任何合适的工艺(诸如例如印刷方法),在第一或覆盖片上产生。

[0094] 在另一个方面,本公开提供了制备上述实施方案中任一个的独立成套的产生无氧环境的培养装置的方法。该方法包括使冷水溶性胶凝剂附着到基部的一部分。当附着到基部时,胶凝剂可为干燥的(例如,以基本上不含水的颗粒的形式),或者胶凝剂可作为液体涂层附着到基部(例如,含水液体涂层),并且随后干燥至基本上不含水的状态。该方法还包括将基部附接(例如,经由压敏粘合剂)到覆盖片。任选地,将基部附接到覆盖片还包括形成防水密封件。

[0095] 基部邻近覆盖片定位,使得附着的胶凝剂的至少一部分面向设置在基部和覆盖片之间的生长隔室。任选地,在任一实施方案中,第一粘合剂层可施加(例如,使用本领域中已知的涂覆工艺)到基部并且冷水溶性胶凝剂可附着到第一粘合剂层。

[0096] 在一个另选的实施方案中,冷水溶性胶凝剂可通过对于使胶凝剂附着到基部描述的工艺中的任一种而附着到覆盖片。如果胶凝剂是液体涂覆的,则干燥附着的胶凝剂可通过本领域中的多个工艺执行。可例如依据美国专利5,601,998中描述的工艺,在烘箱(例如重力烘箱、对流烘箱)中干燥涂层,该专利全文以引用方式并入本文。优选地,干燥附着的胶凝剂,直到其基本上不含水。如本文所用,短语“基本上干燥”、“基本上不含水”等,是指这样的涂层:一旦已允许其与周围环境平衡,则其水含量不超过约已脱水涂层的水含量。

[0097] 该方法还包括将除氧试剂、缓冲液体系和产生二氧化碳的试剂沉积到培养装置的生长隔室中。在任一实施方案中,任一种或所有除氧试剂、缓冲液体系的组分以及产生二氧化碳的试剂可以干燥粉末沉积到生长隔室中。任选地,任一种或所有除氧试剂、缓冲液体系以及产生二氧化碳的试剂可在生长隔室中附着到粘合剂(例如如本文所述的第一粘合剂层或第二粘合剂层)。也可将其它任选的组分(例如,指示试剂、选择剂、营养素)沉积到生长隔室中,任选地,附着到粘合剂层。

[0098] 将基部邻近覆盖片定位,使得附着的胶凝剂面向设置在基部和覆盖片之间的生长隔室可以多种方式执行。例如,将基部和覆盖片邻近彼此定位使得胶凝剂的一部分与生长隔室叠置的代表性示例示于图1-图3中。可见该重叠构型允许操作人员将含水液体沉积在基部和覆盖片之间,从而使得胶凝剂、除氧试剂、以及存在于生长隔室中的其它干燥组分流体连通。

[0099] 在任一实施方案中,本公开的培养装置可包括任选的可剥离地附着到靠近培养装置开口的粘合剂层的可移除凸块。图2A和图2B示出培养装置200的一个实施方案,培养装置200包括分别附着到第一粘合剂层12和第二粘合剂层22的多个可移除凸块(分别为凸块50和凸块51),邻近装置的开口34。可移除凸块防止第一粘合剂层和第二粘合剂层在存储和处理期间彼此附着(并且从而密封开口),直至装置被接种并且凸块被操作人员移除之后。

[0100] 可移除凸块50和凸块51可由任何合适的材料制得(例如,纸、聚合物膜),剥离涂层(例如,低粘附性背胶)可施加到其上以防止凸块材料和粘合剂层之间的超强粘合。

[0101] 根据本公开的装置的生长隔室可具有多种形状,诸如例如图1A的矩型生长隔室。其它合适的形状包括但不限于圆形、椭圆形、多边形、星形、和不规则形状的生长隔室。图3示出具有带开口34的多边形生长隔室的培养装置300的一个实施方案,该开口限定生长隔室30的周边的少于约10%。

[0102] 图4A和图4B示出图3的培养装置300的各种视图,其中装置300还包括多个可移除的凸块(分别为凸块50和凸块51)。

[0103] 在任一实施方案中,根据本公开的装置可通过使干燥组分(例如,胶凝剂、一种或多种除氧试剂、还原剂)中的至少一种附着到载体并且随后使载体在生长隔室中附着到基部或覆盖片而制成。图5A和图5B示出包括所述载体的培养装置300的一个实施方案。

[0104] 装置300包括具有如上文所述的基部10和覆盖片20的主体6。附着到基部10的是如上文所述的第一粘合剂层12。附着到覆盖片20的是如上文所述的第二粘合剂层22。附着到第一粘合剂层12的是任选的载体60。经由任选的第三粘合剂层62附着到载体60的是如本文所述的第一干燥涂层14。附着到第二粘合剂层22的是任选的载体70。经由任选的第四粘合剂层72附着到载体70的是如上文所述的第二干燥涂层24。在任一实施方案中,根据本公开的装置可包括第一载体60(和其上的干燥涂层)、第二载体70(和其上的干燥涂层)或第一载体和第二载体两者以及其上的干燥涂层。

[0105] 第一载体和第二载体可使用本文所述用作基部或覆盖片材料的任何合适的材料制得。第三粘合剂层和第四粘合剂层可包括本文所述用于第一粘合剂层或第二粘合剂层中的任何合适的粘合剂。

[0106] 现已知图5A和图5B的本发明的装置300可易于使用用于基部、覆盖片、和载体的薄膜基底并使用卷对卷处理来涂覆和装配。

[0107] 现已知根据本公开的装置另选地可使用一体基底来构建以形成覆盖片和基部两者。在这些实施方案中,涂层被施加到一体的基本上平坦的基底,其随后被折叠以便产生防水密封件和设置在两部分一体基底之间的生长隔室。

[0108] 图6至图9示出本公开的装置400的一个实施方案的组件中的若干级,其中装置由一体基底构造而成。培养装置400由平面的部分装配的培养装置401形成,该装置401包括如下所述的各种层。图6至图8的部分装配的装置401包括主体8,主体8包括防水基底80。防水基底具有第一主表面81和与第一主表面相背对的第二主表面87。第一主表面81包括第一部分82和与第一部分间隔开的第二部分84。主体8还包括周边边缘89和折叠区域86,该折叠区域86在装配期间折叠以在装配的培养装置400中将第一部分82相对于第二部分84并置放置。

[0109] 第一部分82和第二部分84限定生长隔室30的内壁,生长隔室30包括周边32和提供通向生长隔室的液体通道的开口84。周边32的一部分由防水密封件40限定,其中该部分包括周边的 $>50\%$ 。在任一实施方案中,该部分包括生长隔室30的周边32的 $>50\%$ 。在任一实施方案中,该部分包括生长隔室30的周边32的 $\geq 80\%$ 。在任一实施方案中,该部分包括生长隔室30的周边32的 $\geq 90\%$ 。在任一实施方案中,该部分包括生长隔室30的周边32的 $\geq 95\%$ 。在任一实施方案中,该部分包括生长隔室30的周边32的 $\geq 98\%$ 。在任一实施方案中,该部分包括生长隔室30的周边32的 $\geq 99\%$ 。在任一实施方案中(例如,在装置被接种之后的使用期间,该部分包括生长隔室30的周边32的 100% 。

[0110] 干燥的冷水溶性胶凝剂附着到生长隔室30的部分中的至少一者(例如,第一部分或第二部分84)。胶凝剂可作为第一涂层14的一部分提供,其任选地可附着到第一粘合剂层12,第一粘合剂层12附着到第一部分82。另选地或除此之外,胶凝剂可作为第二涂层24的一部分提供,其任选地可附着到第二粘合剂层22,第二粘合剂层22附着到第二部分84。在任一

实施方案中,第一粘合剂层和第二粘合剂层以及第一涂层和第二涂层如上文所述。

[0111] 干燥的除氧试剂设置在生长隔室30中。在任一实施方案中,除氧试剂可作为散粉设置在生长隔室30中或者其可为附着到第一部分82的第一组合物14的一部分和/或附着到第二部分84的第二组合物24的一部分。

[0112] 在任一实施方案中,装置400还可包括干燥还原剂、指示试剂、产生二氧化碳的试剂、营养素和/或缓冲试剂,如上文所述。

[0113] 在任一实施方案中,装置400的第一涂层14和/或第二涂层24可附着到载体(未示出),如上文所述。

[0114] 图11A-图11E示出根据本公开制备装置的方法的一个实施方案。在任一实施方案中,基本上平面的防水基部10具有涂覆在主表面上的压敏粘合剂12的第一层。合适的基部和粘合剂描述于上文。在第一粘合剂层12之上施加涂层之前,将片状掩模95施加(例如,层合)到基部12上的第一粘合剂层12。掩模95具有周边边缘、中心开口区域和从开口区域延伸至周边34的间隙。当置于基部10上时,开口和掩模95的间隙使第一粘合剂层12的一部分暴露。尽管显示为具有圆形形状,但是预期开口区域可具有多个合适的形状(例如,圆形、正方形、椭圆形、长方形、矩形、多边形等等)中的任一种。

[0115] 掩模95可由各种材料(包括例如纸片或塑料膜)制成。优选地,掩模95在紧贴第一粘合剂层12放置的一侧上涂覆有低粘附性背胶。低粘附性背胶(未示出)有利于将掩模从粘合剂移除而不破坏粘合剂和基部之间的粘结。在将掩模95施加到第一粘合剂层12之后,将第一干燥涂层14(例如粉末材料的涂层,诸如胶凝剂、除氧试剂、和/或如上文所述的其它干燥组分)施加到暴露的粘合剂。图4c示出第一干燥涂层14附着到粘合剂的未被掩模95覆盖的部分。

[0116] 在施加第一干燥涂层14之后,过量的粉末任选地可被移除(例如,通过振动)并且掩模95被移除。移除掩模95使基部10上的剩余的未涂覆第一粘合剂层12暴露,如图11D中所示。为了完成根据本公开的装置的制备,使尺寸设定成覆盖暴露的第一粘合剂层12的覆盖片20层合(例如,使用辊,未示出)到粘合剂,如图11E中所示。装置包括生长隔室30,液体样品(未示出)通过开口34沿装置的边缘被引入生长隔室30中。

[0117] 在又一方面,本公开提供检测微生物的方法。该方法使用上述实施方案中的任一个的培养装置的任一个实施方案。

[0118] 在任一实施方案中,该方法包括经由开口将包含预定体积的含水液体的样品沉积到生长隔室中,任选地密封开口,将培养装置温育足以允许在生长隔室中形成微生物菌落的时间段,以及检测微生物菌落。在任一实施方案中,将包含预定体积的含水液体的样品沉积到生长隔室中包括形成包封(例如,与外部气体环境隔离)在培养装置的生长隔室中的半固体微生物培养基。

[0119] 在任一实施方案中,用于水合和/或接种培养装置的含水液体的预先确定的体积为约0.1毫升至约100毫升。在任一实施方案中,用于水合和/或接种培养装置的含水液体的预先确定的体积为约1毫升至约20毫升。在任一实施方案中,用于水合和/或接种培养装置的含水液体的预先确定的体积为约1毫升。在任一实施方案中,用于水合和/或接种培养装置的含水液体的预先确定的体积为约2毫升。在任一实施方案中,用于水合和/或接种培养装置的含水液体的预先确定的体积为约3毫升。在任一实施方案中,用于水合和/或接种培

养装置的含水液体的预先确定的体积为约4毫升。在任一实施方案中,用于水合和/或接种培养装置的含水液体的预先确定的体积为约5毫升。在任一实施方案中,用于水合和/或接种培养装置的含水液体的预先确定的体积为约10毫升。在任一实施方案中,用于水合培养装置的生长区域的含水液体分布于生长区域内,导致每 20.3cm^2 生长区域内约1毫升液体。

[0120] 在方法的任一实施方案中,将预先确定的体积置于生长隔室中包括同时将样品置于生长隔室中。例如,样品可为液体(例如,待测试微生物污染的水或饮料样品)或者样品可为悬浮在液体载体或稀释剂中的固体或半固体样品。

[0121] 另选地,在任一实施方案中,将预先确定的体积置于生长隔室中不包括同时将样品置于生长隔室中。例如,样品可包括在将预定体积的(优选无菌的)液体载体或稀释剂置于培养装置的生长隔室中之前或之后置于生长隔室中的液体、固体、或半固体材料。

[0122] 有利地,可以在有氧环境中(即空气中)水合和/或接种该培养装置。通常,将用于水合装置的含水液体(其可包含待测试的样品材料)移取到基部和覆盖片之间的生长隔室上。在将预定体积的含水液体沉积到生长隔室中之后,将培养装置任选地密封(例如,通过移除一种或多种可移除凸块,如果存在),以使可用于密封开口的粘合剂层暴露。任选地,可使用平面或凹面涂布器(与用于接种PETRIFILM培养装置的那些涂布器类似),将含水液体均匀地分布于整个生长隔室中。

[0123] 在方法的任一实施方案中,将预先确定的体积置于生长隔室中可包括同时将样品置于生长隔室中。在这些实施方案中,样品可包含含水液体和/或样品可被稀释成含水液体或悬浮在含水液体(例如,缓冲液或无菌培养基)中。

[0124] 另选地,在任一实施方案中,将预先确定的体积置于生长隔室中不包括同时将样品置于生长隔室中。在这些实施方案中,可在将样品置于生长隔室中之前或之后将预先确定的体积的含水液体90置于(例如,通过培养装置500的开口34移取,如图10中所示)生长隔室30中。例如,样品可被捕获到膜过滤器上(未示出),在胶凝剂与含水液体水合之前或之后,膜过滤器被置于生长隔室中。

[0125] 在方法的任一实施方案中,将样品置于生长隔室中包括将一种或多种添加剂置于生长隔室中。可将一种或多种添加剂与样品一起或单独地置于生长隔室中。一种或多种添加剂在该方法中可发挥多种功能。例如,在任一实施方案中,一种或多种添加剂可包括营养素或营养培养基,以有利于装置中的微需氧微生物、微耐氧微生物或专性厌氧微生物的生长。此类营养素和营养培养基是本领域熟知的,并且可基于特定的待培养微生物进行选择。营养素和营养培养基不应显著地干扰除氧试剂。这可易于通过使用如PCT公布W02015/061213的实施例2-3中所述的氧传感器进行测试,该文献全文以引用方式并入本文。

[0126] 另选地或除此之外,在任一实施方案中,添加剂包括一种或多种选择剂(例如抗生素、盐),一种微生物相比至少一种另外的微生物,生长受该选择剂促进的程度更强。在一个实施方案中,一种微生物相比存在于样品中的其它微生物,生长受选择剂促进的程度更强。另选地或除此之外,在任一实施方案中,添加剂包括指示试剂(例如pH指示剂、氧化还原指示剂、显色酶底物、荧光酶底物),用于检测是否存在某种微生物。本领域中具有普通技术的人员将认识到,选择剂和指示试剂都可用于检测某些微生物。选择剂和/或指示剂不应显著地干扰除氧试剂。这可易于如上文所述通过使用氧传感器进行测试。

[0127] 当被生长隔室中的含水液体接触时;干燥组分(例如,除氧试剂、缓冲液体系的组

分、产生二氧化碳的试剂、营养素、指示试剂、还原剂和/或选择剂) 和含水液体形成包含第一溶解氧浓度和第一溶解二氧化碳浓度的混合物。

[0128] 在任一实施方案中,生长隔室中的含水混合物中的第一溶解氧浓度可为基本上抑制专性厌氧微生物、微需氧微生物和/或微耐氧微生物的生长的浓度。在这些实施方案中,使组分用含水流体连通,引发除氧反应,从而将生长隔室中的含水液体中的第一溶解氧浓度降至低于第一浓度的第二浓度(例如,比第一浓度低至少约50%、低至少约60%、低至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、低至少约99%、或低大于99%)。

[0129] 在任一实施方案中,将第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度可包括将生长隔室中的含水混合物中的溶解氧降至足够低的第二浓度,以支持厌氧微生物(例如耐氧细菌或专性厌氧细菌)的生长。

[0130] 在任一实施方案中,将第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度包括在形成混合物后短于或等于约120分钟内,将生长隔室中的含水混合物中的溶解氧降至第二浓度。在任一实施方案中,将第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度包括在形成混合物后短于或等于约90分钟内,将生长隔室中的含水混合物中的溶解氧降至第二浓度。在任一实施方案中,将第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度包括在形成混合物后短于或等于约60分钟内,将生长隔室中的含水混合物中的溶解氧降至第二浓度。在任一实施方案中,将第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度包括在形成混合物后短于或等于约45分钟内,将生长隔室中的含水混合物中的溶解氧降至第二浓度。在任一实施方案中,将第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度包括在形成混合物后短于或等于约30分钟内,将生长隔室中的含水混合物中的溶解氧降至第二浓度。

[0131] 在任一实施方案中,本公开的装置任选地包含产生二氧化碳的试剂。在任一实施方案中,生长隔室中的含水混合物中的第一溶解二氧化碳浓度可为支持微生物的生长的浓度。然而,样品中的一些或所有微生物可在CO₂富集的环境中更快地聚积生物质。因此,在这些实施方案中,将组分与任选产生二氧化碳的试剂放置成含水流体连通,引发产生二氧化碳的反应,从而将生长隔室中的含水混合物中的可用二氧化碳的第一浓度提高到比第一浓度高的第二浓度。当将本公开的培养装置接种并温育时,额外的可用二氧化碳不导致在生长隔室中形成的水凝胶中形成肉眼可见的气泡(即,≥1mm直径的气泡)。相反,产生二氧化碳的试剂增加含水混合物中溶解的二氧化碳的浓度。因此,含有产生二氧化碳的试剂的培养装置可用于涉及检测将可发酵碳水化合物发酵成CO₂气体的方法,所述CO₂气体作为邻近菌落的气泡聚积。

[0132] 如果在将样品材料置于装置中之前将培养装置水合,那么在重新打开装置以用培养材料接种前,任选地可允许冷水溶性胶凝剂(例如,在室温下)水合数分钟直至约30分钟或更长时间,并且形成凝胶。在其中胶凝剂被允许水合并形成凝胶的时间段期间,除氧试剂将水合胶凝剂中的溶解氧浓度从第一浓度降至有利于耐氧微生物或专性厌氧微生物生长的第二浓度,如本文所论述。

[0133] 在培养装置的生长隔室被水合之前或之后,可采用本领域已知的多种方式使样品材料与生长隔室接触。在任一实施方案中,通过将样品材料沉积到生长隔室中,来使样品材料与生长隔室接触。将样品材料沉积到生长隔室中可通过(例如)下列方式实现:用移液器

移取样品材料；使生长隔室与用于获取样品材料的拭子（例如经由开口）接触（例如，通过擦拭表面）；使生长隔室与接种环或接种针接触（例如，采用平板划线技术）；或者将样品捕获装置（如拭子、海绵或膜过滤器）直接地置于生长隔室中。在样品沉积并且培养装置任选地密封之后（注意不要在培养装置中夹带宏观可见的气泡），除氧试剂耗尽生长隔室中的溶解氧。

[0134] 在所述方法的任一实施方案中，在将样品置于生长隔室中并任选地密封之后，将培养装置温育一段时间（例如，预先确定的时间段）。温育条件（例如，温育温度）可影响微生物的生长速率，如本领域中具有普通技术的人员所熟知。例如，在较低温度（例如低于约25℃）温育可使得能检测嗜冷微生物。在较高温度（例如约30℃、约32℃、约35℃、约37℃）温育可利于某些嗜常温微生物更快速生长。

[0135] 在一些实施方案中，在温育之后，可将培养装置温育至少约16小时、至少约18小时、至少约24小时或至少约48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。在某些优选的实施方案中，将培养装置温育约24小时至约48小时。在任一实施方案中，在检测生长隔室中生长的微生物菌落或对其进行计数前，可温育培养装置并在其中维持低氧环境约72小时、约96小时、约120小时、约7天或约8天。在任一实施方案中，将培养装置温育足以允许形成微生物菌落的时间段包括在有氧气氛中将培养装置温育该时间段（即，培养装置不被置于用于温育的低氧容器或手套箱中）。

[0136] 温育接种的培养装置后，所述方法还包括检测微生物菌落。可在培养装置中通过本领域已知的多种技术检测微生物菌落。在合适的温育期后，可通过可观察到的菌落的不存在、生长指示剂（例如，pH指示剂、显色酶底物、氧化还原指示剂诸如TTC、荧光酶底物）无变化和生长培养基中与可发酵碳水化合物的代谢相关的气泡的不存在来在培养装置中检测微生物的不存在。

[0137] 可在视觉上和/或通过使用成像系统来检测与微生物菌落相关的酸性区域。例如，在其中培养基包含溴甲酚紫作为pH指示剂的方法中，培养基将在约中性pH下具有紫色或灰色外观。随着微生物在培养基中生长并发酵碳水化合物（例如，葡萄糖），在邻近生长的细菌菌落处溴甲酚紫指示剂将显示出黄色。例如，在其中培养基包含氯酚红作为pH指示剂的方法中，培养基将在约中性pH下具有红色或紫罗兰色外观。随着微生物在培养基中发酵碳水化合物，在邻近生长的微生物菌落处氯酚红指示剂将显示出黄色。

[0138] 气泡，如果存在于生长隔室中并且与微生物菌落相关（例如，触碰菌落或在距菌落约1mm或更少的某一距离内），那么可在视觉上和/或通过使用成像系统检测。气泡可与可见的菌落和/或可通过邻近微生物菌落的区域中的pH指示剂的颜色改变检测的酸性区域相关。例如，气泡可包含由碳水化合物的厌氧发酵产生的二氧化碳。

[0139] 在上述实施方案的任一者中，所述方法还可包括获取培养装置的图像。在这些实施方案中，检测LAB的存在与否包括显示、打印或分析所述培养装置的图像。该成像系统包括成像装置并且可包括处理器。在一些实施方案中，成像装置可包括线扫描器或面扫描器（例如，相机）。成像装置可包括单色（例如，黑白）或多色（例如，彩色）扫描器。有利的是，单色成像系统可提供较高分辨率的图像，这可改善结果的精确性和/或减少检测所述培养装置中微生物的存在所需的时间。

[0140] 在一些实施方案中，成像系统还包括照明系统。照明系统可包括至少一个广谱可

见光(例如,“白”光)源。在一些实施方案中,照明系统可包括至少一个窄谱可见光源(例如,发射相对较窄带宽的可见光诸如例如红光、绿光或蓝光的发光二极管)。在某些实施方案中,照明系统可包括光发射峰在预选波长(例如,约525nm处)的窄谱可见光源(例如,发光二极管)。

[0141] 图像可从由培养装置的生长隔室中的组分(例如,微生物菌落、生长培养基和指示剂)反射的光获得,或者图像可从透射过培养装置的生长隔室中的组分的光获得。合适的成像系统和对应的照明系统在例如国际专利公布WO 2005/024047和美国专利申请公布US 2004/0101954和US 2004/0102903中有描述,每个专利都以引用方式全文并入本文。合适的成像系统的非限制性示例包括得自美国明尼苏达州圣保罗市的3M公司(3M Company (St.Paul,MN))的PETRIFILM读板机(PPR),得自美国马萨诸塞州诺伍德(Norwood,MA)的Spiral Biotech公司的PETRISCAN菌落计数器,以及得自英国剑桥(Cambridge,U.K.)的Symbiosis公司的PROTOCOL和ACOLYTE平板扫描器。

[0142] 在一些实施方案中,获取图像包括获取波长偏置图像。例如,成像系统可包括将由成像装置采集的光线偏置的偏置滤波器。滤波器元件是本领域已知的,并且包括“截止”滤波器(即允许某个指定波长以上或以下的光波长通过的滤波器)和“带通”滤波器(即允许某个指定上限和下限之间的光波长通过的滤波器)。可将偏置滤波器定位在照明源和培养装置之间。另选地或除此之外,可将偏置滤波器定位在培养装置和成像装置之间。

[0143] 示例性实施方案

[0144] 实施方案A为一种装置,所述装置包括:

[0145] 主体,所述主体包括防水基部、附接到所述基部的防水覆盖片、以及设置在所述防水基部和所述防水覆盖片之间的生长隔室,所述生长隔室具有周边和提供通向所述生长隔室的液体通道的开口;

[0146] 其中所述周边的一部分由防水密封件限定,其中所述部分包括所述周边的>50%;

[0147] 干燥的冷水溶性胶凝剂,所述干燥的冷水溶性胶凝剂在所述生长隔室中附着到所述基部;以及

[0148] 干燥的第一除氧试剂,所述干燥的第一除氧试剂设置在所述生长隔室中。

[0149] 实施方案B为根据实施方案A所述的装置,其中所述主体是基本上二维的。

[0150] 实施方案C为根据实施方案A或实施方案B所述的装置,所述装置还包括设置在所述生长隔室中的有效量的干燥的产生二氧化碳的试剂。

[0151] 实施方案D是根据前述实施方案中任一项所述的培养装置,其中所述产生二氧化碳的试剂基本上由直径为100微米或更小的颗粒组成。

[0152] 实施方案E为根据前述实施方案中任一项所述的装置,所述装置还包括设置在所述生长隔室中的干燥还原剂。

[0153] 实施方案F为根据前述实施方案中任一项所述的装置,所述装置还包括干燥营养素,其中所述营养素设置在所述生长隔室中,其中所述营养素有利于厌氧微生物的生长,其中所述营养素不是所述除氧试剂。

[0154] 实施方案G为根据实施方案F所述的装置,其中所述营养素包含有机碳源。

[0155] 实施方案H为根据实施方案G所述的装置,其中所述有机碳源是不可发酵的。

[0156] 实施方案I为根据前述实施方案中任一项所述的装置,所述装置还包括设置在所

述生长隔室中的干燥的第二除氧试剂。

[0157] 实施方案J为根据前述实施方案中任一项所述的装置,所述装置还包括用于检测活的微生物存在的指示试剂,其中所述指示试剂设置在所述生长隔室中。

[0158] 实施方案K为根据前述实施方案中任一项所述的装置,其中第一干燥组分附着到所述基部,所述第一干燥组分选自所述第一除氧试剂、所述第二除氧试剂、所述还原试剂、所述营养素、所述指示试剂和前述组分中任两种或更多种的组合。

[0159] 实施方案L为根据实施方案K所述的装置,其中所述基部包括在所述生长隔室的至少一部分中设置在所述基部上的第一粘合剂层,其中所述第一干燥组分在所述生长隔室中附着到所述第一粘合剂层。

[0160] 实施方案M为根据前述实施方案中任一项所述的装置:

[0161] 其中所述覆盖片包括在所述生长隔室的至少一部分中设置在所述覆盖片上的第二粘合剂层;

[0162] 其中所述第二干燥组分在所述生长隔室中附着到所述第二粘合剂层。

[0163] 实施方案N为根据实施方案A至实施方案L中任一项所述的装置,所述装置还包括第一载体,其中所述第一干燥组分附着到所述第一载体,其中所述第一载体在所述生长隔室中附着到所述第一粘合剂层。

[0164] 实施方案O为根据实施方案N所述的装置,其中所述第一载体包括涂覆于其上的第三粘合剂层,其中所述第一干燥组分附着到所述第三粘合剂层。

[0165] 实施方案P为根据前述实施方案中任一项所述的装置,其中第二干燥组分附着到所述覆盖片,所述第二干燥组分选自所述第一除氧试剂、所述第二除氧试剂、所述还原试剂、所述营养素、所述指示试剂和前述组分中任两种或更多种的组合。

[0166] 实施方案Q为根据实施方案A至实施方案L中任一项所述的装置,所述装置还包括第二载体,其中所述第二干燥组分附着到第二载体,其中所述第二载体在所述生长隔室中附着到所述第二粘合剂层。

[0167] 实施方案R为根据实施方案Q所述的装置,其中所述第二载体包括涂覆到其上的第四粘合剂层,其中所述第二干燥组分附着到所述第四粘合剂层。

[0168] 实施方案S为根据前述实施方案中任一项所述的装置,其中所述第一平面防水基底还包括靠近所述开口的第一可移除凸块。

[0169] 实施方案T为根据实施方案S所述的装置,其中所述第一可移除凸块包括与其附着的第一闭合粘合剂。

[0170] 实施方案U为根据实施方案T所述的装置,所述装置还包括可剥离地附着到所述第一闭合粘合剂的第一离型衬件。

[0171] 实施方案V为根据前述实施方案中任一项所述的装置,其中所述覆盖片还包括靠近所述开口的第二可移除凸块。

[0172] 实施方案W为根据实施方案V所述的装置,其中所述第二可移除凸块包括与其附着的第二闭合粘合剂。

[0173] 实施方案X为根据实施方案W所述的装置,所述装置还包括可剥离地附着到所述第二闭合粘合剂的第二离型衬件。

[0174] 实施方案Y为一种装置,所述装置包括:

- [0175] 主体,所述主体包括防水基底,所述防水基底包括:
- [0176] 周边边缘:
- [0177] 第一主表面,所述第一主表面包括隔开的第一部分和第二部分;
- [0178] 第二主表面,所述第二主表面与所述第一主表面相背对;
- [0179] 折叠件,所述折叠件将第一部分相对于所述第二部分重叠并置放置;
- [0180] 其中所述第一部分和所述第二部分限定生长隔室的内壁,所述生长隔室包括周边和提供通向所述生长隔室的液体通道的开口;
- [0181] 其中所述周边的一部分由防水密封件限定,其中所述部分包括所述周边的>50%;
- [0182] 冷水溶性胶凝剂,所述冷水溶性胶凝剂在所述生长隔室中附着到所述第一部分;
- 以及
- [0183] 干燥的第一除氧试剂,所述干燥的第一除氧试剂设置在所述生长隔室中。
- [0184] 实施方案Z为根据实施方案Y所述的装置,其中所述主体是基本上二维的。
- [0185] 实施方案AA为根据实施方案Y或实施方案Z所述的装置,所述装置还包括设置在所述生长隔室中的干燥还原剂。
- [0186] 实施方案AB为根据实施方案Y至实施方案AA中任一项所述的装置,所述装置还包括干营养素,其中所述营养素设置在所述生长隔室中,其中所述营养素有利于厌氧微生物的生长,其中所述营养素不是所述除氧试剂。
- [0187] 实施方案AC为根据实施方案AB所述的装置,其中所述营养素包含有机碳源。
- [0188] 实施方案AD为根据实施方案AC所述的装置,其中所述有机碳源是不可发酵的。
- [0189] 实施方案AE为根据实施方案Y至实施方案AD中任一项所述的装置,所述装置还包括设置在所述生长隔室中的干燥的第二除氧试剂。
- [0190] 实施方案AF为根据实施方案Y至实施方案AE中任一项所述的装置,所述装置还包括用于检测活的微生物存在的指示试剂,其中所述指示试剂设置在所述生长隔室中。
- [0191] 实施方案AG为根据实施方案Y至实施方案AF中任一项所述的装置,其中第一干燥组分附着到平面防水基底的第一部分,所述第一干燥组分选自所述第一除氧试剂、所述第二除氧试剂、所述还原试剂、所述营养素、所述指示试剂和前述组分中任两种或更多种的组合。
- [0192] 实施方案AH为根据实施方案AG所述的装置,其中所述平面防水基底包括设置在所述第一部分的至少一部分上的第一粘合剂层,其中所述第一干燥组分在所述生长隔室中附着到所述第一粘合剂层。
- [0193] 实施方案AI为根据实施方案AG所述的装置,所述装置还包括第一载体,其中所述第一干燥组分附着到所述第一载体,其中所述第一载体在所述生长隔室中附着到所述第一粘合剂层。
- [0194] 实施方案AJ为根据实施方案AI所述的装置,其中所述第一载体包括涂覆于其上的第二粘合剂层,其中所述第一干燥组分附着到所述第二粘合剂层。
- [0195] 实施方案AK为根据实施方案Y至实施方案AJ中任一项所述的装置,其中第二干燥组分附着到所述平面防水基底的所述第二部分,所述第二干燥组分选自所述第一除氧试剂、所述第二除氧试剂、所述还原试剂、所述营养素、所述指示试剂和前述组分中任两种或更多种的组合。

- [0196] 实施方案AL为根据实施方案AK所述的装置：
- [0197] 其中所述防水基底包括设置在所述第二部分的至少一部分上的第三粘合剂层；
- [0198] 其中所述第二干燥组分在所述生长隔室中附着到所述第三粘合剂层。
- [0199] 实施方案AM为根据实施方案AK所述的装置，所述装置还包括第二载体，其中所述第二干燥组分附着到第二载体，其中所述第二载体在所述生长隔室中附着到所述第二粘合剂层。
- [0200] 实施方案AN为根据实施方案AM所述的装置，其中所述第二载体包括涂覆到其上的第四粘合剂层，其中所述第二干燥组分附着到所述第四粘合剂层。
- [0201] 实施方案A0为根据前述实施方案中任一项所述的装置，其中所述部分包括所述周边的至少80%。
- [0202] 实施方案AP为根据实施方案A0所述的装置，其中所述部分包括所述周边的至少90%。
- [0203] 实施方案AQ为根据实施方案AP所述的装置，其中所述部分包括所述周边的至少95%。
- [0204] 实施方案AR为根据实施方案AQ所述的装置，其中所述部分包括所述周边的100%。
- [0205] 实施方案AS为根据前述实施方案中任一项所述的装置，其中所述冷水溶性胶凝剂选自羟丙基甲基纤维素、黄原胶、瓜尔胶、刺槐豆胶、羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、藻胶、以及它们的组合。
- [0206] 实施方案AT为根据前述实施方案中任一项所述的装置，其中所述第一除氧试剂是水溶性的。
- [0207] 实施方案AU为根据前述实施方案中任一项所述的装置，其中所述第一除氧试剂选自硫酸铁铵、氯化铁、三价铁盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐。
- [0208] 实施方案AV为根据实施方案I至实施方案AU中任一项所述的装置，其中所述第二除氧试剂是水溶性的。
- [0209] 实施方案AW为根据实施方案AV所述的装置，其中所述第二除氧试剂选自抗坏血酸及其盐、以及能够催化消耗分子氧的反应的酶。
- [0210] 实施方案AX为根据前述实施方案中任一项所述的装置，其中所述还原剂选自二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇、巯基乙酸的盐、以及前述中任两种或更多种的组合。
- [0211] 实施方案AY为根据前述实施方案中任一项所述的装置，其中所述防水密封件包括粘合剂。
- [0212] 实施方案AZ为根据实施方案AY所述的装置，其中所述粘合剂包括压敏粘合剂。
- [0213] 实施方案BA为根据前述实施方案中任一项所述的装置，其中所述基部的内表面是基本上平坦的。
- [0214] 实施方案BB为根据前述实施方案中任一项所述的装置，其中所述覆盖片的内表面是基本上平坦的。
- [0215] 实施方案BC是一种方法，所述方法包括：
- [0216] 将样品沉积到根据前述权利要求中任一项所述的装置的生长隔室中；
- [0217] 在有利于厌氧微生物生长的条件下温育所述装置；以及
- [0218] 检测所述生长隔室中所述厌氧微生物菌落的指示。

[0219] 实施方案BD为根据实施方案BC所述的方法,所述方法还包括将含水液体沉积到所述生长隔室中。

[0220] 实施方案BE为根据实施方案BD所述的方法,其中所述样品设置在所述含水液体中。

[0221] 实施方案BF为根据实施方案BD或实施方案BE所述的方法,其中将所述含水液体沉积到所述生长隔室中包括沉积预先确定的体积的所述含水液体。

[0222] 实施方案BG为根据实施方案BF所述的方法,其中沉积预先确定的体积包括沉积约0.1mL至约100mL。

[0223] 实施方案BH为根据实施方案BC至实施方案BG中任一项所述的方法,其中所述方法还包括密封所述开口。

[0224] 实施方案BI为根据实施方案BC至实施方案BH中任一项所述的方法,其中温育所述装置包括将所述装置温育7天或更少的时间段。

[0225] 实施方案BJ为根据实施方案BI所述的方法,其中温育所述装置包括将所述装置温育96小时或更少的时间。

[0226] 实施方案BK为根据实施方案BJ所述的方法,其中温育所述装置包括将所述装置温育72小时或更少的时间段。

[0227] 实施方案BL为根据实施方案BJ所述的方法,其中温育所述装置包括将所述装置温育48小时或更少的时间段。

[0228] 实施方案BM为根据实施方案BJ所述的方法,其中温育所述装置包括将所述装置温育24小时或更少的时间段。

[0229] 实施方案BN为根据实施方案BC至实施方案BM中任一项所述的方法,其中在沉积所述样品之前,所述生长隔室在其中含有干燥组分,所述干燥组分选自所述冷水溶性胶凝剂、所述第一除氧试剂、所述第二除氧试剂、所述还原剂、所述营养素、所述指示试剂以及上述干燥组分中任两种或更多种的组合。

[0230] 实施方案B0为一种装置,所述装置包括:

[0231] 主体,所述主体包括防水基部、附接到所述基部的防水覆盖片、和设置在所述防水基部和所述防水覆盖片之间的生长隔室,所述生长隔室具有周边和提供通向所述生长隔室的液体通道的开口;

[0232] 其中所述周边的一部分由防水密封件限定,其中所述部分包括所述周边的>50%;

[0233] 干燥的冷水溶性胶凝剂,所述干燥的冷水溶性胶凝剂在所述生长隔室中附着到所述基部;以及

[0234] 干燥的产生二氧化碳的试剂,所述干燥的产生二氧化碳的试剂设置在所述生长隔室中。

[0235] 通过下面的实施例进一步说明了本发明的目的和优点,但这些实施例中列举的具体材料和用量以及其它条件和细节不应解释为是对本发明不当的限制。

[0236] 实施例

[0237] 实施例1:装置构造(图案涂覆的,单面的)

[0238] 75 μ m(3.0密耳)聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)膜(威斯康星州新伯林泰科罗的Melanex 454(Melanex 454,Tekra,New Berlin,WI))用美国专利5,409,838的实施例1中所

述的丙烯酸异辛酯/丙烯酰胺压敏粘合剂(PSA)涂覆。具有从中间移除的7.62cm×10.16cm(3英寸×4英寸)正方形的硅氧烷涂覆的纸离型衬件(D#63BL KFT H/O 548440/000;德国斯图加特市的Loprex股份有限公司(Loprex GmbH, Stuttgart, Germany))被用于掩蔽粘合剂承载体。暴露的粘合剂为用冷水溶性胶凝剂和氧清除剂/还原剂(表1)的各种混合物粉末涂覆的。均匀地施加粉末,并通过用手摇动该膜随后移除离型衬件,将过量的粉末从粘合剂层去除。将一条硅氧烷涂覆的纸离型衬件附着到膜的粉末涂覆的部分的7.62cm(3英寸)侧之一上方的粘合剂。然后将一片125μm(5密耳)PET膜(威斯康星州新伯林泰科罗的Melanex 454(Melanex 454, Tekra, New Berlin, WI))层合到形成小袋的剩余的暴露粘合剂,小袋具有防止在一端密封的离型衬件。

[0239] 实施例2:装置构造(图案涂覆的,双面的)

[0240] 75μm(3.0密耳)密耳聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)膜(威斯康星州新伯林泰科罗的Melanex 454(Melanex 454, Tekra, New Berlin, WI))用美国专利5,409,838的实施例1中所述的丙烯酸异辛酯/丙烯酰胺压敏粘合剂(PSA)涂覆。具有从中间移除的7.62cm×10.16cm(3英寸×4英寸)正方形的硅氧烷涂覆的纸离型衬件被用于掩蔽粘合剂承载体。暴露的粘合剂为用冷水溶性胶凝剂和氧清除剂/还原剂(表1)的各种混合物粉末涂覆的。均匀地施加粉末,并通过用手摇动该膜随后移除离型衬件,将过量的粉末从粘合剂层去除。将一条硅氧烷涂覆的纸离型衬件附着到膜的粉末涂覆的部分的7.62cm(3英寸)侧之一上方的粘合剂。具有附着的离型衬件的两种粉末涂覆的膜以该方式制得并且与面向内且重叠的粉末涂覆的部分和也重叠的附着的离型衬件层合在一起(见图2)。

[0241] 实施例3:装置构造(粉末涂覆的载体基底,单面的)

[0242] 75μm(3.0密耳)聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)膜(威斯康星州新伯林泰科罗的Melanex 454(Melanex 454, Tekra, New Berlin, WI))用美国专利5,409,838的实施例1中所述的丙烯酸异辛酯/丙烯酰胺压敏粘合剂(PSA)涂覆。粘合剂是用冷水溶性胶凝剂和氧清除剂/还原剂(表1)的各种混合物粉末涂覆的。均匀地施加粉末,并通过用手摇动该膜,将过量的粉末从粘合剂层去除。将粉末涂覆的膜切成7.62cm×10.16cm(3英寸×4英寸)的矩形并置于10.16cm×12.7cm(4英寸×5英寸)的粘合剂涂覆的PET片的中心。将一条硅氧烷涂覆的纸离型衬件附着到粉末涂覆的载体膜的7.62cm(3英寸)侧之一上方的粘合剂涂覆的膜。然后将一片125μm(5密耳)PET膜(威斯康星州新伯林泰科罗的Melanex 454(Melanex 454, Tekra, New Berlin, WI))层合到形成小袋的剩余的暴露粘合剂,小袋具有防止在一端密封的离型衬件。

[0243] 实施例4:装置构造(粉末涂覆的载体基底,双面的)

[0244] 75μm(3.0密耳)聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)膜(威斯康星州新伯林泰科罗的Melanex 454(Melanex 454, Tekra, New Berlin, WI))用美国专利5,409,838的实施例1中所述的丙烯酸异辛酯/丙烯酰胺压敏粘合剂(PSA)涂覆。粘合剂是用冷水溶性胶凝剂和氧清除剂/还原剂(表1)的各种混合物粉末涂覆的。均匀地施加粉末,并通过用手摇动该膜,将过量的粉末从粘合剂层去除。将粉末涂覆的膜切成7.62cm×10.16cm(3英寸×4英寸)的矩形并置于10.16cm×12.7cm(4英寸×5英寸)的粘合剂涂覆的PET片的中心。将一条硅氧烷涂覆的纸离型衬件附着到粉末涂覆的载体膜的7.62cm(3英寸)侧之一上方的粘合剂涂覆的膜。两种构造以该方式制得并且与面向内且重叠的粉末涂覆的载体膜和也重叠的附着的离型衬

件层合在一起(见图5)。

[0245] 实施例5:装置构造(一种粉末和一种发酵液涂覆的载体,双面的)

[0246] 构造的第一部分通过用美国专利5,409,838的实施例1中所述的丙烯酸异辛酯/丙烯酰胺压敏粘合剂(PSA)涂覆75 μ m(3.0密耳)聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)膜(威斯康星州新伯林泰科罗的Melanex 454(Melanex 454,Tekra,New Berlin,WI))制得。粘合剂是用冷水溶性胶凝剂和氧清除剂/还原剂(表1)的各种混合物粉末涂覆的。均匀地施加粉末,并通过用手摇动该膜,将过量的粉末从粘合剂层去除。将粉末涂覆的膜切成7.62cm \times 10.16cm(3英寸 \times 4英寸)的矩形并置于10.16cm \times 12.7cm(4英寸 \times 5英寸)的粘合剂涂覆的PET片的中心。将一条硅氧烷涂覆的纸离型衬件附着到粉末涂覆的载体膜的7.62cm(3英寸)侧之一上方的粘合剂涂覆的膜。

[0247] 构造的第二部分通过如下方式制得:用培养基制剂(BD Bacto胰蛋白胨10g/L(美国新泽西州新富兰克林的碧迪公司(Becton Dickinson Corp,New Franklin,NJ))、Amresco大豆蛋白胨10g/L(美国俄亥俄州索伦的Amresco公司(Amresco,Solon,OH))、BD Bacto酵母2g/L(美国新泽西州新富兰克林的碧迪公司(Becton Dickinson Corp,New Franklin,NJ))、MgSO₄-7H₂O 4g/L(马萨诸塞州比尔里卡的EMD米利波尔(EMD Millipore,Billerica,MA))、60%乳酸钠糖浆8ml/L(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇有限公司(Sigma Aldrich Co.,St.Louis,MO))、醋酸钠5g/L(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇有限公司(Sigma Aldrich Co.,St.Louis,MO))、NaCl 10g/L(马萨诸塞州比尔里卡的EMD米利波尔(EMD Millipore,Billerica,MA))、NH₄Cl 0.2g/L(美国宾夕法尼亚州森特瓦利的杰帝贝柯公司(JT Baker,Center Valley,PA))、M150瓜尔胶8g/L,用NaOH将pH调节至7.3,在高剪切下混合)以300 μ m(12.0密耳)厚度涂覆75 μ m(3.0密耳)聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)膜(威斯康星州新伯林泰科罗的Melanex 454(Melanex 454,Tekra,New Berlin,WI)),随后在180 $^{\circ}$ C在溶剂烘箱中10分钟。将7.62cm \times 10.16cm(3英寸 \times 4英寸)的发酵液涂覆的PET片切割并置于10.16cm \times 12.7cm(4英寸 \times 5英寸)的粘合剂涂覆的PET片的中心。将一条硅氧烷涂覆的纸离型衬件附着到发酵液涂覆的载体膜的7.62cm(3英寸)侧之一上方的粘合剂涂覆的膜。

[0248] 构造的第一部分和第二部分是层合的粉末涂层向内至发酵液涂层向内并且附着的离型衬件也重叠的(见图5)。这导致具有内部微生物生长隔室的小袋构造通过离型衬件在一侧上保持开口,内部微生物生长隔室具有相反的粉末和发酵液涂覆侧。

[0249] 实施例6:硫酸盐还原细菌培养原液的生长和保持

[0250] SRB脱硫脱硫弧菌(*Desulfovibrio desulfuricans*) (ATCC#29577;弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,Manassas,VA))和普通脱硫弧菌(*Desulfovibrio vulgaris*) (ATCC#29579;弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,Manassas,VA))的培养原液在改性的乳酸钠培养基(酵母提取物1g(美国新泽西州新富兰克林的碧迪公司(Becton Dickinson Corp,New Franklin,NJ))、MgSO₄-7H₂O 1g(马萨诸塞州比尔里卡的EMD米利波尔(EMD Millipore,Billerica,MA))、NH₄Cl 0.4g(美国宾夕法尼亚州森特瓦利的杰帝贝柯公司(JT Baker,Center Valley,PA))、K₂HPO₄ 0.01g(俄亥俄州索伦的MP Biochemicals公司(MP Biochemicals LLC,Solon,OH))、NaCl 5g(马萨诸塞州比尔里卡的EMD米利波尔(EMD

Millipore, Billerica, MA)、抗坏血酸钠0.1g(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇有限公司(Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO)、乳酸钠(60%) 4ml(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇有限公司(Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO)), 用NaOH(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇有限公司(Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO))将pH调节至7.3, 在使用丁基橡胶塞和铝褶的鲍尔奇管中在97%氮/3%氢气氛下高压灭菌后立即用管装起来)中生长和保持。通过使用充气的1ml注射器将1/100稀释回到改性的乳酸钠培养基的管中来使培养物每周通过一次。将培养物在30°C下温育48小时, 并且然后在4°C下保持另外的5天。在第6次通过之后, 培养物被扔掉并且由冷冻机原液新接种。

[0251] 实施例7: 装置的接种

[0252] 实施例1-实施例5的装置如下接种。通过直接将它们倒入或使用10ml的无菌移液管将样品(5ml或10ml)置于装置中。将离型衬件移除并且装置在两个平行的树脂玻璃板之间滑动以便将样品推到生长区的顶部并排除空气。将现在装置口处暴露的PSA压制在一起以形成密封件并将装置平展放置用于温育。温育在30°C下执行至多10天以允许提供细菌生长的时间。菌落在视觉上看为由不溶性硫化铁析出物的形成导致的小黑点, 不溶性硫化铁析出物来自细菌硫化氢产物和培养基中存在的铁的组合。

[0253] 实施例8: 使用双面粉末构造中的抗坏血酸盐进行的硫酸盐还原细菌的生长

[0254] 实施例4的装置使用来自表1的粉末涂层混合物1-9构造。在表2中所述的有氧培养基中连续地稀释来自实施例6的脱硫脱硫弧菌(*Desulfovibrio desulfuricans*) (ATCC# 29577) 和普通脱硫弧菌(*Desulfovibrio vulgaris*) (ATCC#29579) 的培养原液。将5ml的量的 10^{-6} 稀释液接种并且如实施例7中所详述来温育装置。96小时之后检查装置的SRB生长, 并将结果报告于表3中。

[0255] 实施例9: 使用双面粉末构造中的亚铁进行的硫酸盐还原细菌的生长

[0256] 使用来自表1的粉末涂层混合物1和10-12构造实施例4的装置。在表4中所述的有氧培养基中连续地稀释来自实施例6的普通脱硫弧菌(*Desulfovibrio vulgaris*) (ATCC# 29579) 的培养原液。将5ml的量的 10^{-5} 稀释液接种并且如实施例7中所详述来温育装置。72小时之后检查装置的SRB生长, 并将结果报告于表3中。

[0257] 实施例10: 具有另选的载体网形状的装置构造。

[0258] 用图3中所示的另选的载体网形状构造实施例3中的装置。

[0259] 实施例11: 具有另选的载体网形状的装置构造。

[0260] 用图3中所示的另选的载体网形状构造实施例4中的装置。

[0261] 实施例12: 具有另选的载体网形状的装置构造。

[0262] 用图3中所示的另选的载体网形状构造实施例5中的装置。

[0263] 实施例13: 使用双面粉末/发酵液构造中的亚铁进行的硫酸盐还原细菌的生长。

[0264] 使用来自表1的粉末涂层混合物11构造实施例5的装置。在磷酸盐缓冲盐水(Sigma)中连续地稀释来自实施例6的普通脱硫弧菌(*Desulfovibrio vulgaris*) (ATCC# 29579) 的培养原液。将5ml的量的 10^{-5} 、 10^{-6} 、和 10^{-7} 稀释液接种并且如实施例7中所详述来温育装置。120小时之后检查装置的SRB生长, 并将结果报告于表3中。

[0265] 实施例14: 使用不同的凝胶强度进行的硫酸盐还原细菌的生长

[0266] 使用来自表1的粉末涂层混合物2构造实施例3的装置。在表2中所述的有氧培养基

中连续地稀释来自实施例6的脱硫脱硫弧菌 (*Desulfovibrio desulfuricans*) (ATCC# 29577) 和普通脱硫弧菌 (*Desulfovibrio vulgaris*) (ATCC#29579) 的培养原液。将2ml、3ml、4ml、或5ml的量的 10^{-7} 稀释液接种并且如实施例7中所详述来温育装置。72小时之后检查装置的SRB生长,并将结果报告于表5中。

[0267] 比较例1:总计数薄膜培养装置的构造

[0268] 75 μ m (3.0密耳) 聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 膜 (威斯康星州新伯林泰科罗的 Melanex 454 (Melanex 454, Tekra, New Berlin, WI)) 用美国专利5,409,838的实施例1中所述的丙烯酸异辛酯/丙烯酰胺压敏粘合剂 (PSA) 涂覆。用来自表1的混合物2粉末涂覆粘合剂。均匀地施加粉末,并通过用手摇动该膜,将过量的粉末从粘合剂层去除。将粉末涂覆的膜切成7.62cm \times 10.16cm (3英寸 \times 4英寸) 的矩形。使用粉末侧面向内的双面胶带沿7.62cm (3英寸) 一侧将两个矩形接合。

[0269] 比较例2:具有隔片的薄膜培养装置的构造

[0270] 75 μ m (3.0密耳) 聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 膜 (威斯康星州新伯林泰科罗的 Melanex 454 (Melanex 454, Tekra, New Berlin, WI)) 用美国专利5,409,838的实施例1中所述的丙烯酸异辛酯/丙烯酰胺压敏粘合剂 (PSA) 涂覆。用来自表1的混合物2粉末涂覆粘合剂。均匀地施加粉末,并通过用手摇动该膜,将过量的粉末从粘合剂层去除。将粉末涂覆的膜切成7.62cm \times 10.16cm (3英寸 \times 4英寸) 的矩形。

[0271] 100 μ m (4密耳) 密耳聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 膜 (LAB板底部膜?) 用美国专利5,409,838的实施例1中所述的丙烯酸异辛酯/丙烯酰胺压敏粘合剂 (PSA) 涂覆。将其中6厘米直径的圆被移除的硅氧烷涂覆的纸离型衬件用于掩蔽粘合剂。用来自表1的混合物2粉末涂覆暴露的粘合剂。均匀地施加粉末,并通过用手摇动该膜随后移除离型衬件,将过量的粉末从粘合剂层去除。将具有61mm直径的圆形开口的泡沫隔片 (聚苯乙烯泡沫;76mm宽 \times 102mm长 \times 0.57mm厚) 粘合层压到第一层的经粘合剂涂覆的一侧。将具有附着的隔片的粉末涂覆的膜切成7.62cm \times 10.16cm (3英寸 \times 4英寸) 的矩形。

[0272] 使用粉末侧面向内的双面胶带沿7.62cm (3英寸) 一侧将上文所述的两个膜接合。

[0273] 比较例3:薄膜培养装置中的SRB生长

[0274] 构造比较例1的装置并且在表2中所述的有氧培养基中连续地稀释来自实施例6的脱硫脱硫弧菌 (*Desulfovibrio desulfuricans*) (ATCC#29577) 的培养原液,将抗坏血酸盐氧化酶 (加州圣路易斯奥比斯波的 Calzyme 实验室 (Calzyme Laboratories, San Luis Obispo, CA)) 加入所述有氧培养基至4U/ml的最终浓度。通过升起顶部膜,在底部膜的中间分配样品,以及轻轻地将顶部膜背面朝下放置来将3ml的 10^{-5} 、 10^{-6} 、和 10^{-7} 稀释液接种。将板在30 $^{\circ}$ C在环境气氛中或在用97%N₂、3%H₂的气体吹扫的厌氧室中温育。72小时之后检查装置的SRB生长,并将结果报告于表6中。

[0275] 比较例4:薄膜培养装置中的SRB生长

[0276] 构造比较例2的装置并且在表2中所述的有氧培养基中连续地稀释来自实施例6的脱硫脱硫弧菌 (*Desulfovibrio desulfuricans*) (ATCC#29577) 的培养原液,将抗坏血酸盐氧化酶 (加州圣路易斯奥比斯波的 Calzyme 实验室 (Calzyme Laboratories, San Luis Obispo, CA)) 加入所述有氧培养基至4U/ml的最终浓度。通过升起顶部膜,在底部膜的中间分配样品,以及轻轻地将顶部膜背面朝下放置来将3ml的量的 10^{-5} 、 10^{-6} 、和 10^{-7} 稀释液接种。

将板在30℃在环境气氛中或在用97%N₂、3%H₂的气体吹扫的厌氧室中温育。72小时之后检查装置的SRB生长,并将结果报告于表6中。

[0277] 实施例15:小袋状培养装置的构造和使用

[0278] 构造实施例3的装置,其中除了背衬膜为48ga PET/98ga WOPP/.00035”箔/2密耳Barex(伊利诺州水晶湖市的Technipaq公司(Technipaq, Crystal Lake, IL))而不是75μm(3密耳)PET和如下粉末涂层混合物;M150瓜尔胶5g(丹麦哥本哈根的杜邦丹尼斯克(DuPont Danisco, Copenhagen, Denmark))、Fortefiber HB Ultra 89.3g(密歇根州米德兰的陶氏化学公司(Dow Chemical Company, Midland, MI))、FeSO₄-7H₂O 3g(美国宾夕法尼亚州森特瓦利的杰帝贝柯公司(JT Baker, Center Valley, PA))、抗坏血酸钠0.60g(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇有限公司(Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO))、硫代乙酸钠:1.5g(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇有限公司(Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO))、CaSO₄:0.60g(美国宾夕法尼亚州森特瓦利的杰帝贝柯公司(JT Baker, Center Valley, PA))。如表1中研磨FeSO₄-7H₂O和抗坏血酸钠。在有氧培养基中连续地稀释来自实施例6的脱硫脱硫弧菌(*Desulfovibrio desulfuricans*) (ATCC#29577)和普通脱硫弧菌(*Desulfovibrio vulgaris*) (ATCC#29579)的培养原液;K₂HPO₄ 0.56g/L(俄亥俄州索伦的MP Biochemicals公司(MP Biochemicals LLC, Solon, OH))、KH₂PO₄ 0.11g/L(俄亥俄州索伦的MP Biochemicals公司(MP Biochemicals LLC, Solon, OH))、NH₄Cl 1.0g/L(美国宾夕法尼亚州森特瓦利的杰帝贝柯公司(JT Baker, Center Valley, PA))、MgSO₄-7H₂O 3.0g/L(马萨诸塞州比尔里卡的EMD米利波尔(EMD Millipore, Billerica, MA))、60%乳酸钠4.0mL/L(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇有限公司(Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO))、Bacto酵母提取物1.0g/L(美国新泽西州新富兰克林的碧迪公司(Becton Dickinson Corp, New Franklin, NJ))、Bacto胰蛋白胨1g/L(美国新泽西州新富兰克林的碧迪公司(Becton Dickinson Corp, New Franklin, NJ))、Resazurin:1mg/L(俄亥俄州索伦的MP Biochemicals公司(MP Biochemicals LLC, Solon, OH))、ATCC维生素混合物10mL/L(弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, Manassas, VA))、ATCC微量矿物混合物10mL/L。用氢氧化钠将pH调节至7.3,并过滤灭菌。将5ml的量的10⁻⁶和10⁻⁷稀释液接种并且如实施例7中所详述来温育装置。96小时之后检查装置的SRB生长。两种菌株均生长良好,并且单个菌落在这时易于计数。

[0279] 表1:粉末涂层配方。所有值以克表示。C₆H₇NaO₆(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇有限公司(Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO))和FeSO₄-7H₂O(美国宾夕法尼亚州森特瓦利的杰帝贝柯公司(JT Baker, Center Valley, PA))以晶体形式获得并在混合和粉末涂覆之前研磨至<100μm的平均粒度。HPMC(羟丙基甲基纤维素;Fortefiber HB Ultra)得自密歇根州米德兰的陶氏化学公司(Dow Chemical Company (Midland, MI))。

[0280]

| | HPMC | C6H7NaO 6 | FeSO4-7H2 O |
|----|------|--------------|----------------|
| 1 | 100 | - | - |
| 2 | 100 | 10.00 | - |
| 3 | 100 | 5.000 | - |
| 4 | 100 | 2.500 | - |
| 5 | 100 | 1.250 | - |
| 6 | 100 | 0.625 | - |
| 7 | 100 | 0.313 | - |
| 8 | 100 | 0.156 | - |
| 9 | 100 | 0.078 | - |
| 10 | 100 | - | 5.00 |
| 11 | 100 | - | 2.50 |
| 12 | 100 | - | 1.25 |

[0281] 表2:SRB培养基制剂。用氢氧化钠将pH调节至7.3并过滤灭菌。

[0282]

| 组分 | 量 (g/L) | 来源 |
|-------------------|---------|---|
| 酪蛋白的酶消化(胰蛋白 胨) | 5 | 美国新泽西州新富兰克林的 碧迪公司 (Becton Dickinson Corp, New Franklin, NJ) |

[0283]

| | | |
|-------------------|-----|---|
| 大豆的酶消化(大豆蛋白 胨) | 5 | 美国俄亥俄州索伦的 Amresco 公司 (Amresco, Solon, OH) |
| 酵母提取物 | 1 | 美国新泽西州新富兰克林的 碧迪公司 (Becton Dickinson Corp, New Franklin, NJ) |
| 硫酸镁七水合物 | 2.0 | 马萨诸塞州比尔里卡的 EMD 米利波尔 (EMD Millipore, Billerica, MA) |
| 氯化钠 | 5.0 | 马萨诸塞州比尔里卡的 EMD 米利波尔 (EMD Millipore, Billerica, MA) |
| 乳酸钠 | 2.5 | 马萨诸塞州比尔里卡的 EMD 米利波尔 (EMD Millipore, Billerica, MA) |
| 硫酸亚铁铵 | 0.5 | 马萨诸塞州比尔里卡的 EMD 米利波尔 (EMD Millipore, Billerica, MA) |

[0284] 表3:SRB在装置中的生长使用抗坏血酸盐或亚铁。其中SRB的多种稀释液针对给定装置接种,稀释液在括号中指示。

| <u>实施例</u> | <u>粉末混合物</u> | <u>普通脱硫弧菌 (D. vulgaris)</u> | <u>脱硫脱硫弧菌 (D. desulfuricans)</u> |
|------------|--------------|-----------------------------|----------------------------------|
| 8 | 1 | +++ | +++ |
| 8 | 2 | +++ | +++ |
| 8 | 3 | +++ | +++ |
| 8 | 4 | +++ | +++ |
| 8 | 5 | +++ | +++ |

[0285]

| | | | | |
|--------|----|----|--------------------|-----|
| [0286] | 8 | 6 | +++ | +++ |
| | 8 | 7 | +++ | +++ |
| | 8 | 8 | ++ | ++ |
| | 8 | 9 | - | + |
| | 9 | 1 | - | - |
| | 9 | 10 | +++ | +++ |
| | 9 | 11 | +++ | +++ |
| | 9 | 12 | +++ | +++ |
| | 13 | 11 | TNTC (10^{-5}) | ND |
| | 13 | 11 | +++ (10^{-6}) | ND |
| | 13 | 11 | +++ (10^{-7}) | ND |

[0287] +++=在整个板中旺盛生长,单个菌落可易于计数

[0288] ++=生长与围绕板边缘的一些抑制一起存在,单个菌落可计数

[0289] +=生长与围绕板边缘的明显抑制一起存在,菌落难以辨别

[0290] -=未观察到黑色析出物

[0291] TNTC=多到无法计数

[0292] ND=未测定

[0293] 表4:SRB培养基制剂。用氢氧化钠将pH调节至7.3并过滤灭菌。

[0294]

| 组分 | 量 (g/L) | 来源 |
|----------------|---------|--|
| 酪蛋白的酶消化 (胰蛋白酶) | 10 | 美国新泽西州新富兰克林的碧迪公司 (Becton Dickinson Corp, New Franklin, NJ) |
| 酵母提取物 | 1 | 美国新泽西州新富兰克林的碧迪公司 (Becton Dickinson Corp, New Franklin, NJ) |
| 磷酸二氢钾 | 0.2 | 俄亥俄州索伦的 MP Biochemicals 公司 (MP |

[0295]

| | | |
|---------|-------|---|
| | | Biochemicals LLC, Solon, OH) |
| 氯化铵 | 0.053 | 美国宾夕法尼亚州森特瓦利的杰帝贝柯公司 (JT Baker, Center Valley, PA) |
| 硫酸镁七水合物 | 2.0 | 马萨诸塞州比尔里卡的EMD 米利波尔 (EMD Millipore, Billerica, MA) |
| 氯化钠 | 5.0 | 马萨诸塞州比尔里卡的EMD 米利波尔 (EMD Millipore, Billerica, MA) |
| 乳酸钠 | 2.5 | 密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇有限公司 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) |

[0296] 表5:SRB在具有变化的凝胶强度的装置中的生长。

| 种菌体积 (ml) | 普通脱硫弧菌 (<i>D. vulgaris</i>) | 脱硫脱硫弧菌 (<i>D. desulfuricans</i>) |
|-----------|----------------------------------|------------------------------------|
| 2 | + | - |
| 3 | ++ | + |
| 4 | +++ | +++ |
| 5 | +++ | +++ |

[0298] +++=在整个板中旺盛生长,单个菌落可易于计数

[0299] ++=生长与围绕板边缘的一些抑制一起存在,单个菌落可计数

[0300] +=生长与围绕板边缘的明显抑制一起存在,菌落难以辨别

[0301] -=未观察到黑色析出物

[0302] 表6:SRB在常规纸片构造中的生长。

[0303]

| 实施例 | 气氛 | 稀释液 | 生长 |
|-----|----|-----------|----|
| 17 | 环境 | 10^{-4} | - |
| 17 | 环境 | 10^{-5} | - |

| | | | |
|----|----|-----------|-----|
| 17 | 环境 | 10^{-6} | - |
| 17 | 厌氧 | 10^{-4} | +++ |
| 17 | 厌氧 | 10^{-5} | +++ |
| 17 | 厌氧 | 10^{-6} | +++ |
| 18 | 环境 | 10^{-4} | ++ |
| 18 | 环境 | 10^{-5} | + |
| 18 | 环境 | 10^{-6} | - |
| 18 | 厌氧 | 10^{-4} | +++ |
| 18 | 厌氧 | 10^{-5} | +++ |
| 18 | 厌氧 | 10^{-6} | +++ |

[0304] +++=在整个板中旺盛生长,单个菌落可易于计数

[0305] ++=生长与围绕板边缘的一些抑制一起存在,单个菌落不可计数

[0306] +=生长与围绕板边缘的明显抑制一起存在,菌落难以辨别

[0307] -=未观察到黑色析出物

[0308] 实施例16:用于富集CO₂的培养条件的装置的构造

[0309] 可构造与实施例15中所描述装置类似的装置,除了粉末涂层混合物可包含0.6g碳酸氢钠,而非抗坏血酸钠。可选择培养基来使乳酸菌而非SRB生长。用于涂覆胶凝剂的粘合剂可包含氯化三苯基四氮唑(TTC),如美国专利4,565,783中所述。该装置可用同型发酵或异型发酵的乳酸菌或其混合物的稀释悬浮液接种。接种的装置可在37°C下温育约48小时。可观察到装置的可见红色菌落(由于TTC的渗透),其中一些由于葡萄糖发酵而具有与之相关的气泡。

[0310] 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。在本申请的公开内容和以引用的方式并入本文的任何文献的一个或多个公开内容之间存在任何不一致的情况下,应以本申请的公开内容为准。前述具体实施方式和实施例仅为了清楚地理解本发明而给出。它们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型形式将包括在由权利要求书所限定的本发明范围内。

[0311] 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。

[0312] 在不脱离本发明的实质和范围的前提下,可进行各种修改。这些以及其它实施方案均在以下权利要求书的范围内。

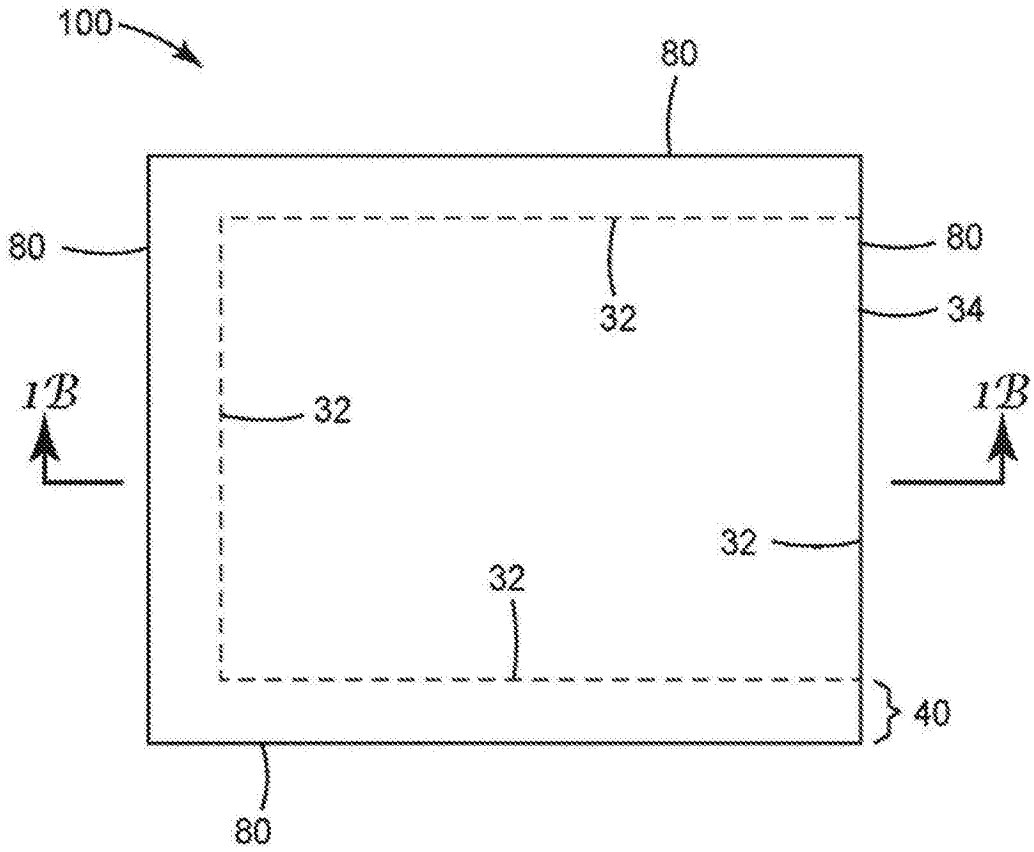


图1A

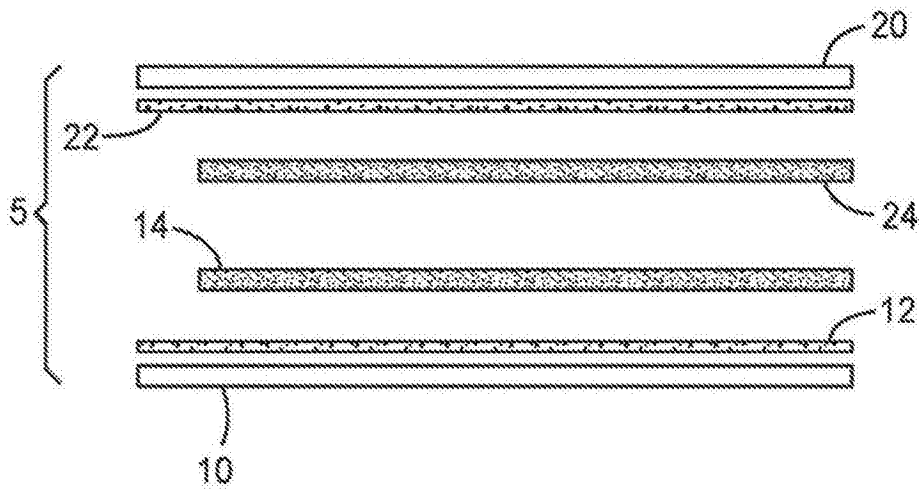


图1B

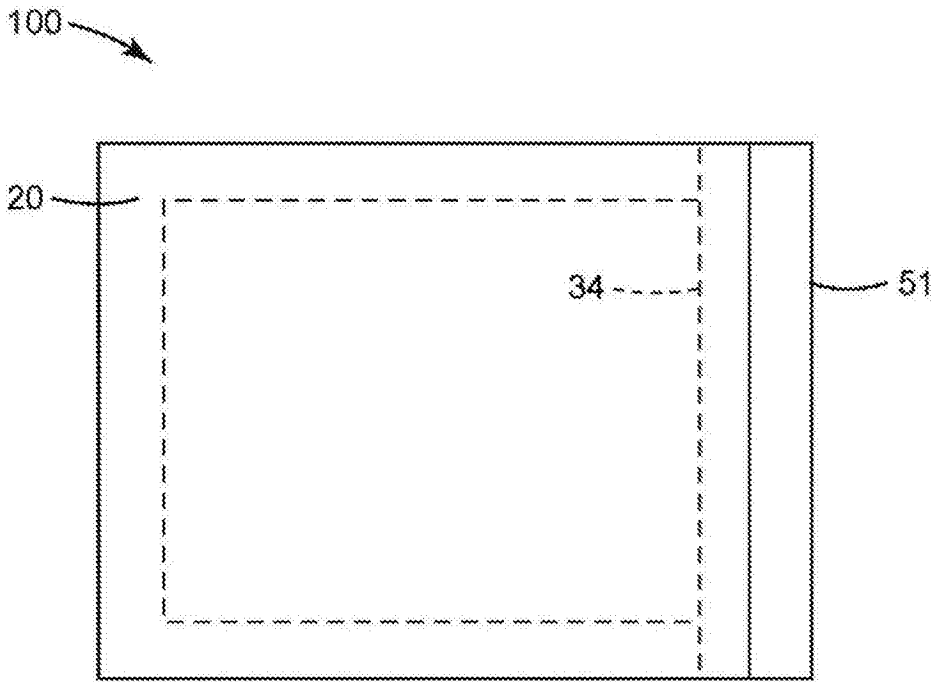


图2A

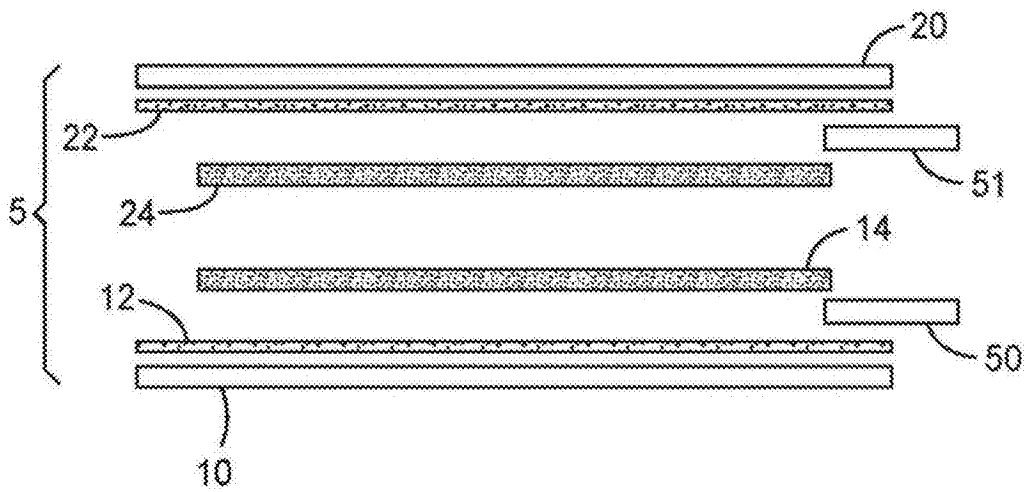


图2B

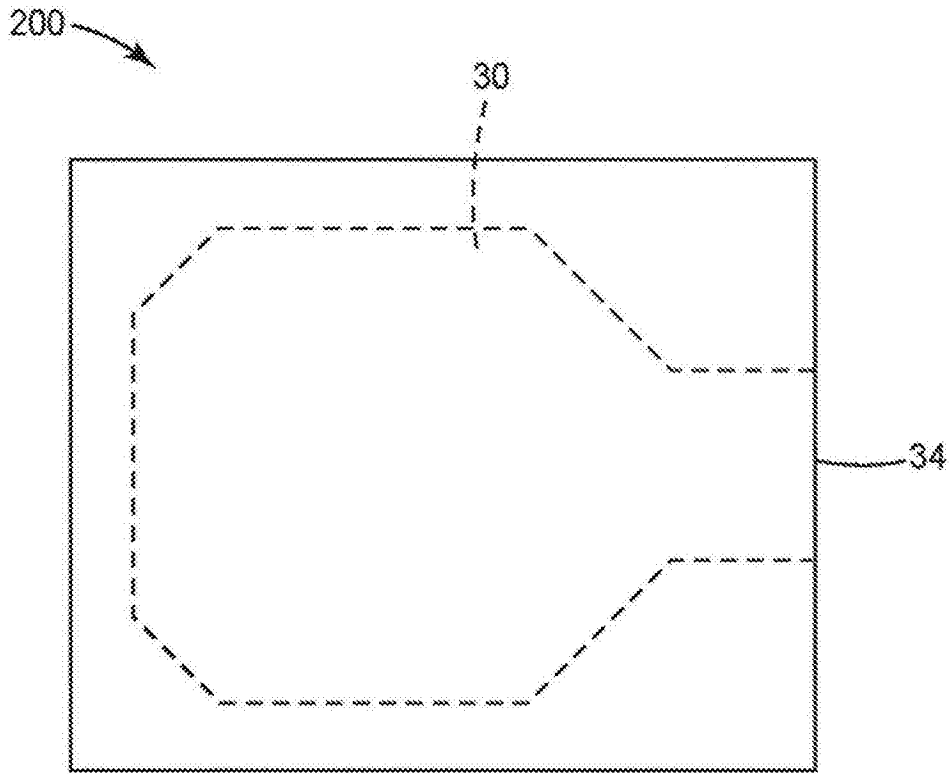


图3

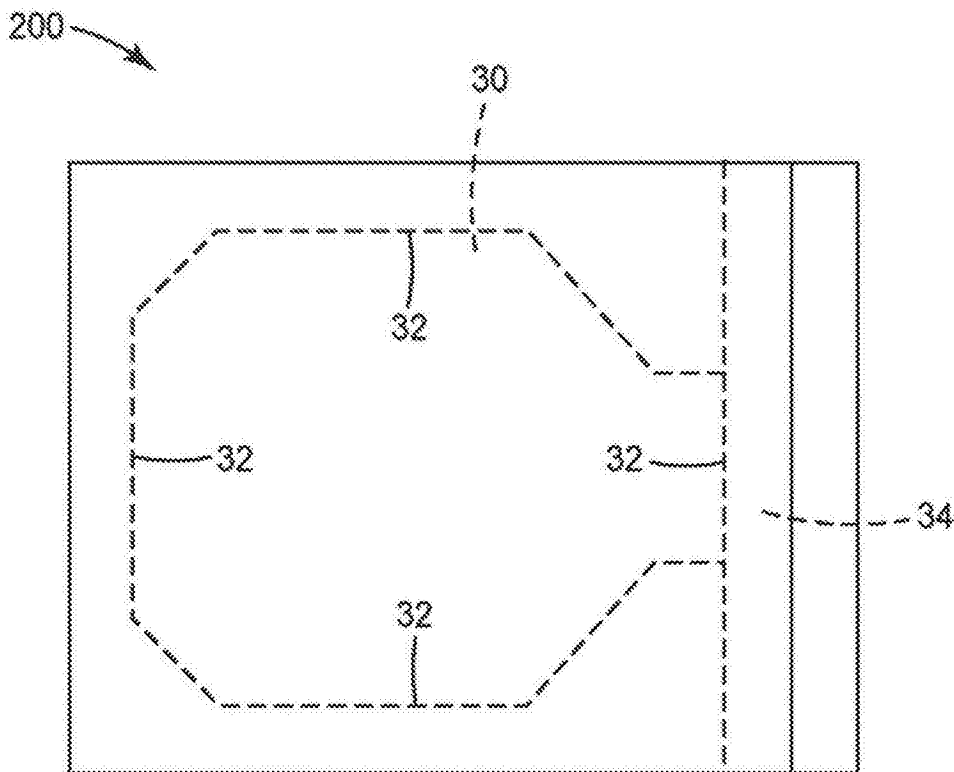


图4A

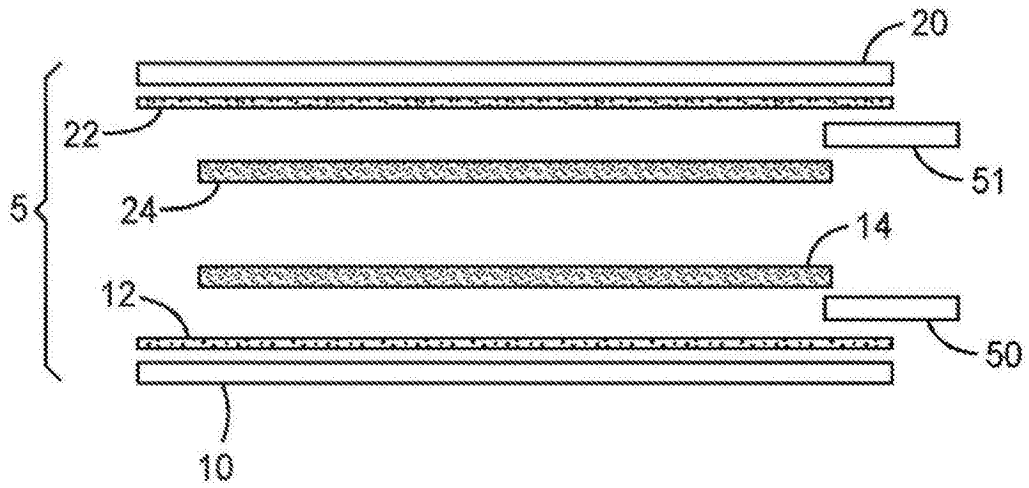


图4B

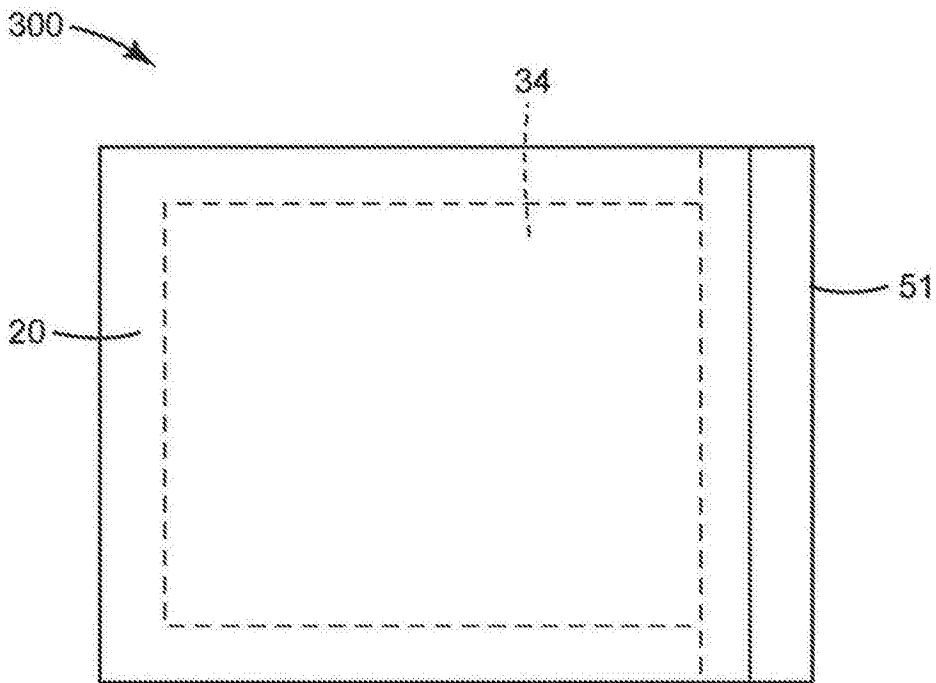


图5A

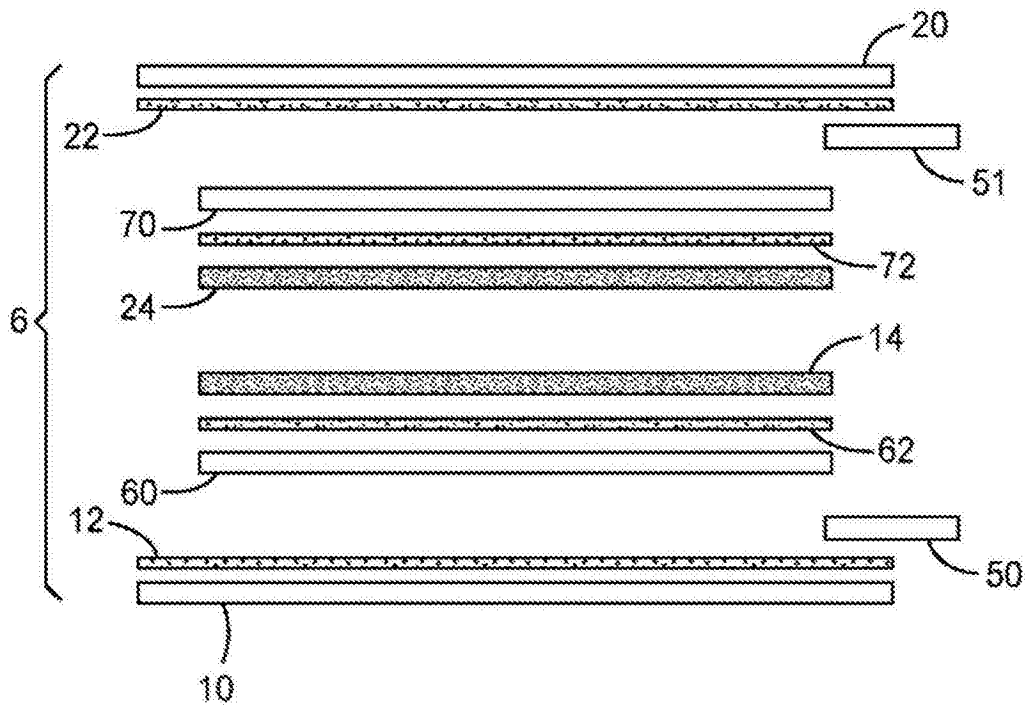


图5B

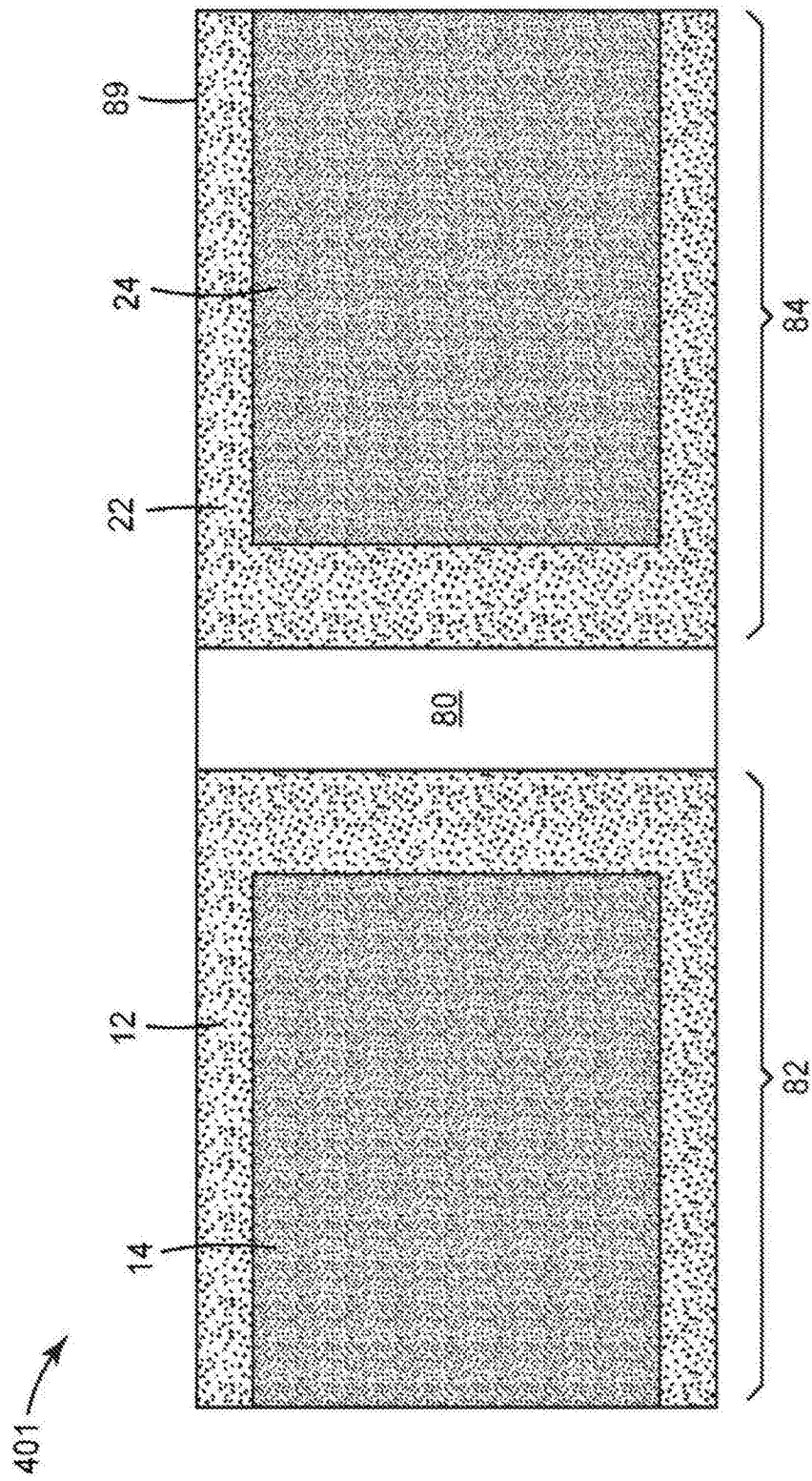


图6

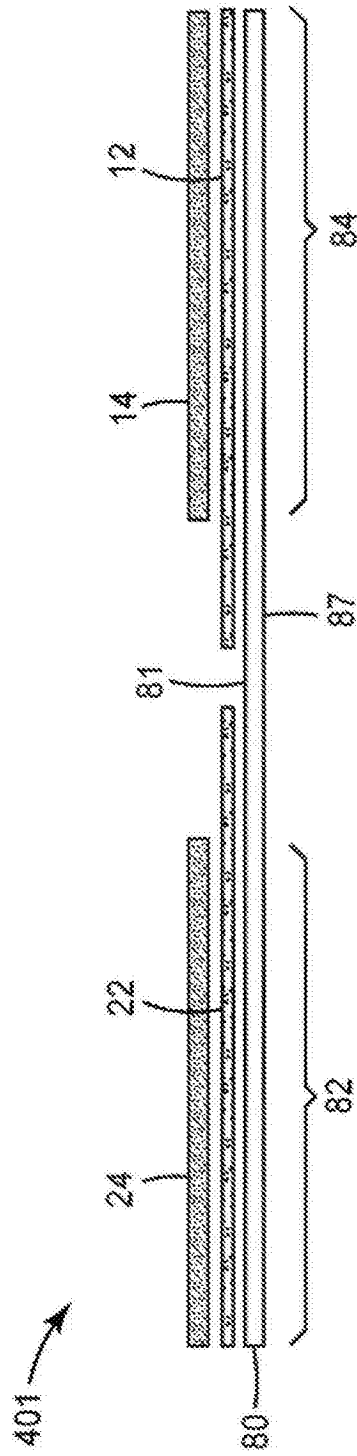


图7

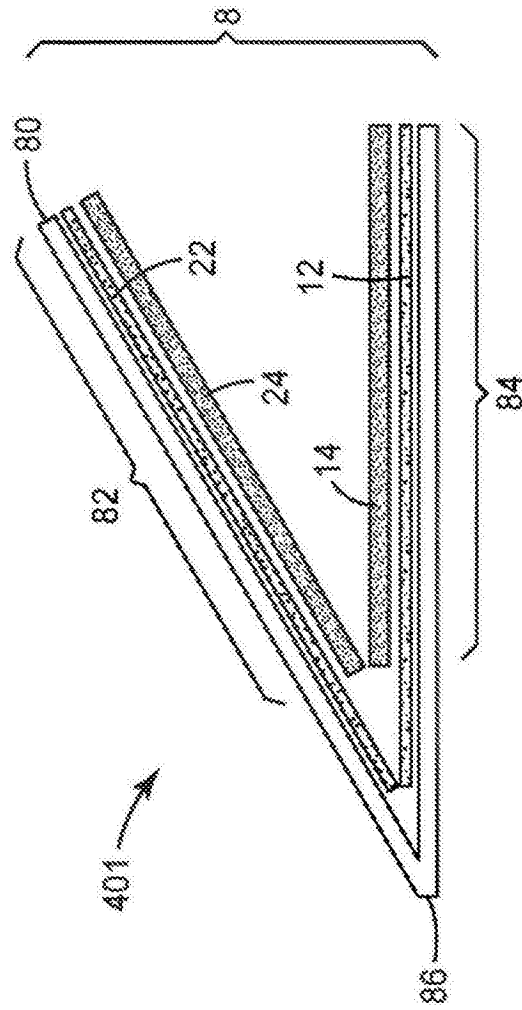


图8

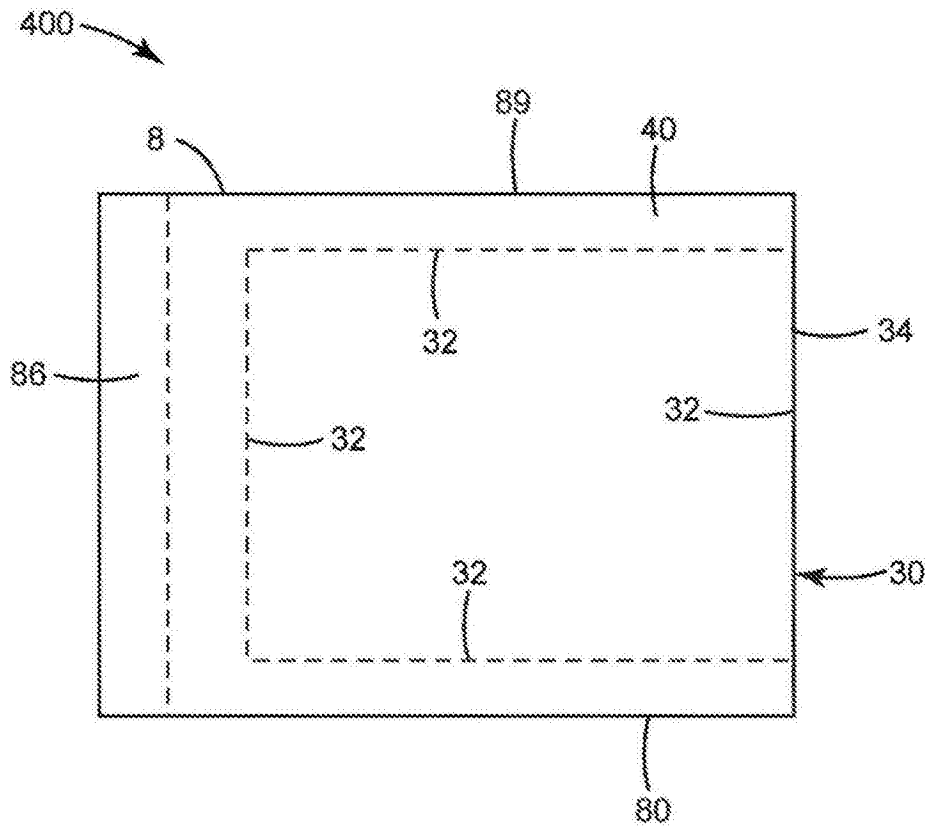


图9

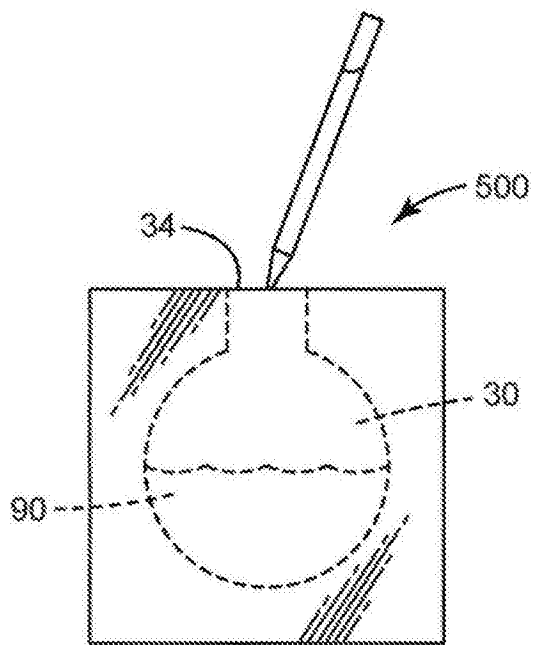


图10

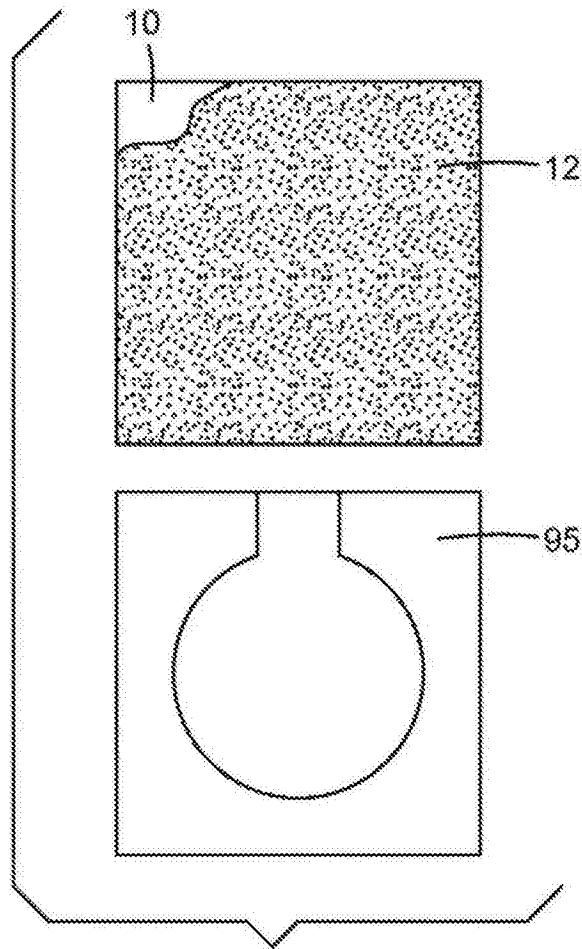


图11A

图11A

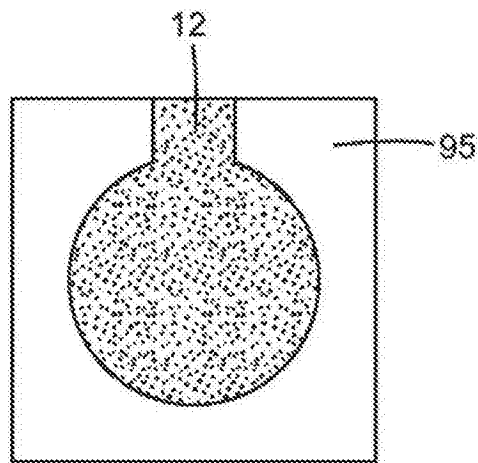


图11B

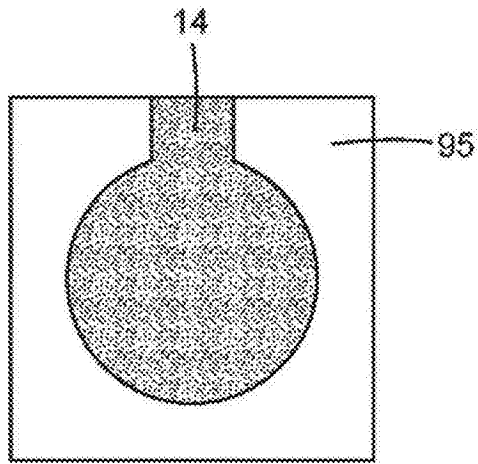


图11C

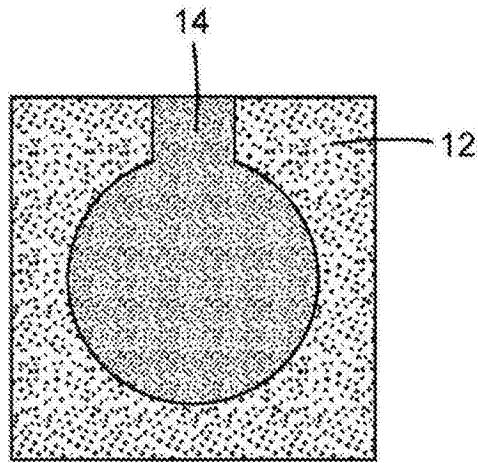


图11D

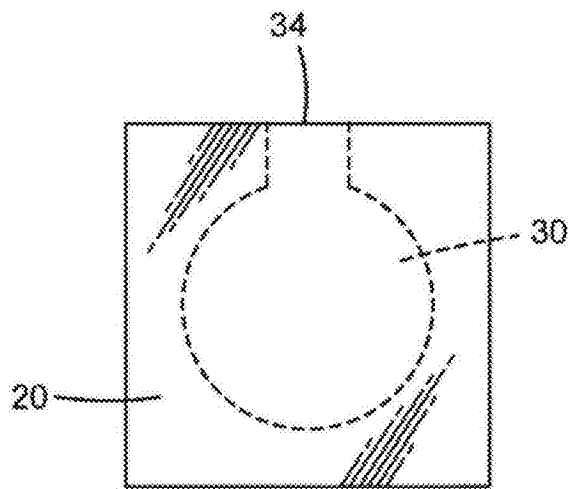


图11E