



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114592031 A

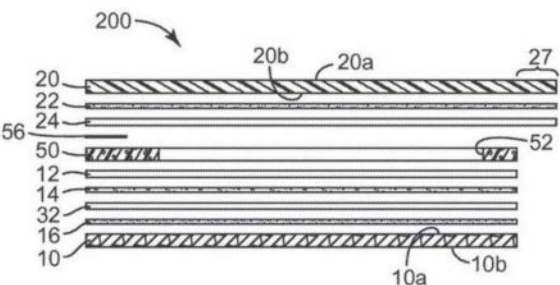
(43) 申请公布日 2022. 06. 07

(21) 申请号 202210173734.4
(22) 申请日 2015.03.05
(30) 优先权数据
61/949,631 2014.03.07 US
(62) 分案原申请数据
201580012546.1 2015.03.05
(71) 申请人 3M创新有限公司
地址 美国明尼苏达州
(72) 发明人 塞拉嘉·常德拉帕蒂
特拉·M·诺德比
(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219
专利代理师 郭国清 宫方斌
(51) Int. Cl.
C12Q 1/04 (2006.01)

权利要求书2页 说明书33页 附图3页

(54) 发明名称
用于检测好氧细菌的制品和方法

(57) 摘要
本发明涉及用于检测好氧细菌的制品和方法。具体地,本发明提供了一种用于检测样本中的好氧细菌的薄膜培养装置。所述培养装置包括:具有第一主表面和第二主表面的自支撑基底片;附接到所述基底片的覆盖片;设置在所述基底片与所述覆盖片之间的样本接收区;第一层,所述第一层包含附着到所述样本接收区的一部分的基本上干燥的、冷水可溶的第一水凝胶形成组合物;以及多种指示剂,所述多种指示剂设置在附着到所述基底片或所述覆盖片的至少一个层中。所述多种指示剂包括用于检测不同糖苷酶活性成分的三种指示剂、用于检测烷基酯酶酶活性成分的指示剂、用于检测磷酸酶酶活性成分的指示剂和氧化还原指示剂。本发明还提供了一种使用所述培养装置的方法。



1. 一种检测样本中的好氧细菌的非诊断目的的方法,所述方法包括:
使样本材料和含水液体在装置的样本接收区中接触以形成经接种的培养装置;
将所述经接种的培养装置温育22小时至26小时,包括22小时和26小时;以及
检测所述经接种的培养装置中的细菌菌落;
其中所述装置包括:
具有第一主表面和第二主表面的自支撑基底片;
附接到所述基底片的覆盖片;
设置在所述基底片与所述覆盖片之间的样本接收区;
第一层,所述第一层包含附着到所述基底片的所述第一主表面的干燥的、冷水可溶的第一水凝胶形成组合物,其中所述第一水凝胶形成组合物包含胶凝剂混合物,所述胶凝剂混合物包含质量比为1:1的瓜尔胶和黄原胶;以及
多种指示剂,所述多种指示剂包括:
5-溴-4-氯-3-吡啶基乙酸酯、5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-吡喃半乳糖苷、5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-吡喃葡萄糖苷、5-溴-4-氯-3-吡啶基- α -D-吡喃葡萄糖苷和5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸酯对甲苯胺盐;
包含四唑𬰐染料的氧化还原指示剂;
其中所述多种指示剂中的每种设置在附着到所述基底片或所述覆盖片的至少一个层中,其中当预定体积的含水液体沉积在所述样本接收区中时,所述至少一个层与所述样本接收区流体连通;并且另外其中
所述好氧细菌包括选自以下的细菌:荧光假单胞杆菌、蜡状芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、斯氏芽孢杆菌、粪肠球菌、铜绿假单胞菌、普通变形杆菌、酯香微杆菌、乳酪链球菌、假单胞菌属和粪产碱菌。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述装置还包括第二层,所述第二层包含设置在所述基底片与所述第一层之间的第一粘合剂组合物。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述装置还包括附着到所述基底片的透气膜。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一水凝胶形成组合物还包含营养物质以利于好氧细菌的生长,其中所述第一水凝胶形成组合物附着到所述基底片或所述覆盖片的至少一部分,其中所述部分与所述样本接收区流体连通。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述覆盖片包括第一主表面,其中所述覆盖片的所述第一主表面面向所述基底片的所述第一主表面,其中所述培养装置还包括:
包含第二粘合剂组合物的第三层,其中所述第三层附着到所述覆盖片的一部分;以及
包含干燥的、冷水可溶的第二水凝胶形成组合物的第四层,其中所述第四层附着到所述第三层。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述装置还包含选自下列的营养物质:L-精氨酸、脱脂乳、D-海藻糖以及前述营养物质的任两种或更多种的组合。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中检测所述经接种的培养装置中的细菌菌落包括检测所述经接种的培养装置中是否存在甲脒染料或所述指示剂中至少一种的所述可检测报

告基团,其中检测是否存在所述甲酴染料或所述可检测报告基团可指示细菌菌落是否存在。

用于检测好氧细菌的制品和方法

[0001] 本发明专利申请是国际申请号为PCT/US2015/018844,国际申请日为2015年3月5日,进入中国国家阶段的申请号为201580012546.1,发明名称为“用于检测好氧细菌的制品和方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2014年3月7日提交的美国临时专利申请No.61/949,631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

[0004] 本发明涉及用于检测好氧细菌的制品和方法。具体地,本发明提供了一种用于检测样本中的好氧细菌的薄膜培养装置。本发明还提供了一种使用所述培养装置的方法。

背景技术

[0005] 好氧平板计数(APC)被用作样本(例如,食品样本)中微生物总负载量的指标。通常,采用倾注平板法、表面涂布法、螺旋平板计数法或滤膜法进行APC;所有这些方法通常利用琼脂培养基使微生物生长并进行计数。

[0006] 用于培养细菌的培养基通常通过将固化剂分散在含有营养物质和特定微生物生长所必需的其他成分的水溶液中来制备。遗憾的是,使用常规固化剂对最终用户来讲通常不方便。举例来说,当采用标准“平板计数”或“倾注平板”法确定液体样本(例如,水或乳)中微生物的数量时,使用常规琼脂培养基特别不便又耗时。通常大批制备并提前杀菌的琼脂培养基在沸水中溶化,或者通过暴露于流动蒸汽而溶化。然后将热琼脂小心冷却到大约45℃,再倒入培养皿中。然后制备一系列测试样本的稀释液,将每种稀释液的等分试样置于培养皿中。接着将经冷却但仍呈液态的琼脂培养基倾注到每个培养皿中,与测试样本的等分试样混合,然后涡旋混合,并使其固化。温育之后,对每个培养皿中生长的菌落数量进行目测计数。通过这种方式,可确定存在于测试样本中的微生物或菌落形成单位的数量。

[0007] 最重要的是,大多数用于对好氧细菌进行计数的常规方法需要至少48小时的温育期才能得到准确的定量结果。这些方法的长温育期可能需要储存食品若干天,直至最终得出污染好氧细菌的存在或浓度。

[0008] 薄膜培养装置也可用于使好氧细菌生长并进行计数。美国专利No.4,565,783和No.5,681,712公开了用于培养和计数好氧细菌的装置,这两篇专利的全文以引用方式并入本文。

[0009] 因此,需要改进的测试方法和相关材料。如果可以简化测试工序,并在较短时间段内获得测试结果,那么制造商将能够发布产品,从而降低储存成本,同时不牺牲产品质量和完整性。

发明内容

[0010] 本公开整体涉及一种用于培养和检测微生物的装置。此外,本公开涉及一种用于

培养和检测样本中微生物的方法。具体地讲,本公开涉及在干燥的可复水培养装置中快速检测好氧和耐氧细菌,所述培养装置包含以高浓度掺入粘合剂组合物中的多种指示剂。所述多种指示剂包括用于检测烷基酯酶活性成分的指示剂、用于检测磷酸酶活性成分的指示剂、用于检测不同糖苷酶活性成分的三种指示剂以及氧化还原指示剂。有利的是,所述多种指示剂能够对多种好氧细菌进行快速检测和计数。甚至更有利的是,特定指示剂连同其浓度以及用于为微生物提供指示剂的装置允许在约48小时或更短时间内,优选在约26小时或更短时间内对好氧和/或耐氧细菌进行检测和计数。

[0011] 在一个方面,本公开提供了一种用于培养和检测微生物的装置。该装置可包括:具有第一主表面和第二主表面的自支撑基底片;附接到其的覆盖片;设置在基底片与覆盖片之间的样本接收区;第一层,其包含附着到基底片的第一主表面的基本上干燥的、冷水可溶的第一水凝胶形成组合物;以及多种指示剂。所述多种指示剂可包括用于检测不同糖苷酶活性成分的三种酶活性成分指示剂、用于检测烷基酯酶活性成分的酶活性成分指示剂、用于检测磷酸酶活性成分的酶活性成分指示剂以及氧化还原指示剂。所述多种酶活性成分指示剂中的每种可包含可检测的报告基团。所述多种指示剂中的每种可设置在附着到基底片或覆盖片的至少一个层中,其中当预定体积的含水液体沉积在样本接收区中时,所述至少一个层与样本接收区流体连通。

[0012] 在上述任一实施方案中,氧化还原指示剂可包括四唑染料。在上述任一实施方案中,四唑染料可包括氯化三苯基四唑。在上述任一实施方案中,所述装置还可包括第二层,该第二层包含设置在基底片与第一层之间的第一粘合剂组合物,其中所述装置任选地可包括附着到基底片的透气膜。在上述任一实施方案中,所述装置还可包括具有孔隙的水不溶性隔片,该隔片被附接到基底片或覆盖片并且孔隙被定位在基底片与覆盖片之间,其中该孔隙限定样本接收区的外围边界。

[0013] 在另一方面,本公开提供了一种检测样本中的好氧细菌的方法。该方法可包括使样本材料和含水液体在根据前述任一实施方案所述的装置的样本接收区中接触以形成经接种的培养装置,温育该经接种的培养装置一段时间,然后检测该培养装置中的细菌菌落。在所述方法的任一实施方案中,检测培养装置中的细菌菌落可包括检测培养装置中是否存在甲脎染料或所述指示剂中至少一种的可检测报告基团,其中检测是否存在甲脎染料或可检测报告基团可指示细菌菌落是否存在。

[0014] 如本文所用,术语“粉末”是指具有适用于本发明薄膜培养装置(一种或多种)的平均直径的一种或多种胶凝剂或营养物质的颗粒状材料,优选地直径为约10-400微米,更优选地直径为约30-90微米;

[0015] 如本文所用,“复水的培养基”是指用含水液体对冷水可溶性粉末进行复水所形成的溶液或凝胶。

[0016] 如本文所用,术语“冷水可溶性粉末”是指当与含水测试样本混合时在室温水(例如,约18℃至24℃)中形成凝胶的粉末。

[0017] 如本文所用,术语“微生物和水蒸汽基本上不可透过的”是指这样的覆盖片:其防止在装运、储存和使用薄膜培养装置(一种或多种)的过程中不期望地污染和水化冷水可溶性粉末的下面层,并避免复水的培养基变干燥,使得复水的培养基适合支持微生物在温育期间生长。

[0018] 如本文所用,术语“好氧细菌”通常是指单细胞、原核微生物,即在有氧呼吸中能够利用分子氧作为末端氧化剂来产生用于细胞过程(例如,代谢、生物合成、复制)的能量。好氧细菌包括兼性厌氧细菌,兼性厌氧细菌除能够利用分子氧作为末端氧化剂之外,还能够通过发酵产生能量。好氧细菌包括存在于或共存于测试样本中的一个或多个菌种。术语“好氧细菌”也指存在于例如测试样本中的一系列好氧细菌。术语“好氧细菌”不限于意指任何给定数目的这类微生物或菌种,且并不意味着排除尚未被发现但以后可能被本领域的技术人员识别而包括在此定义中的菌种。

[0019] 如本文所用,术语“测试样本”是指从食物产品、人或动物测试受试者、药物或化妆品、土壤、水、空气、其他环境源或任何由其可确定好氧和/或耐氧细菌的存在和任选地计数的其他源所取得的组分或部分。可使用本领域的技术人员已知的技术(包括例如倾倒、移液、擦拭、过滤和接触)从源中取得测试样本。此外,测试样本可经历各种本领域已知的样本制备过程,包括例如共混、匀质、均化、富集、选择性富集或稀释。

[0020] 如本文所用,术语“基本上不含水”指示水含量不大于周围环境的大致水含量。

[0021] 词语“优选的”和“优选地”是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] 如本文所用,“一种(个)”、“所述(该)”、“至少一种(个)”以及“一种(个)或多种(个)”可互换使用。因此,例如,包含“一种”指示剂的培养装置可被解释为是指该培养装置可包含“一种或多种”指示剂。

[0023] 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多个的组合。

[0024] 另外,在本文中,通过端点表述的数值范围包括该范围内所含的所有数值(例如,1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等)。

[0025] 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示例性实施例来描述本发明的这些和其他特征及优点。

[0026] 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。以下附图和具体实施方式更具体地举例说明了示例性实施方案。通过具体实施方式、附图和权利要求书,其他特征、目标和优点将变得显而易见。

附图说明

[0027] 图1为本公开的培养装置的一个实施方案的示意性剖面侧视图,其中示出了某些特征结构。

[0028] 图2为图1的培养装置的示意性剖面侧视分解图。

[0029] 图3为图1的培养装置的平面图。

[0030] 图4为本公开的培养装置的一个另选实施方案的示意性剖面侧视图。

[0031] 图5为图4的培养装置的示意性剖面侧视分解图。

[0032] 图6为图4的培养装置的平面图。

具体实施方式

[0033] 在详细解释本公开的任何实施方案之前,应当理解,本发明在其应用中不仅限于下文描述内容中提及或下文附图中示出的构造细节和部件布置方式。本发明容许其他实施方案,也容许以各种方式实施或执行。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所列出的项目及它们的等同形式以及额外项目。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方式使用,既涵盖直接地连接、联接,又涵盖间接地连接、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,可采用其他的实施方案,并且可以在不偏离本发明范围的情况下作出结构变化或逻辑变化。此外,术语例如“前部”、“后部”、“顶部”、“底部”等等仅用于在元件彼此有关时描述元件,但绝非意在描述设备的具体取向、指明或暗示设备的必要或必需取向、或规定本文所述本发明在使用时将如何使用、安装、显示或定位。

[0034] 好氧细菌是无所不在的微生物,其中一些在食物和饮料的腐败中具有显著作用。好氧细菌在样本(例如,食物样本、水样本或环境表面样本)中的数量可指示在食物、水或环境中可能存在病原性微生物。此外,食物或饮料样本中的总好氧细菌的数量可作为指示取样于其中的食物或饮料的剩余储存寿命的指标。因此,对于大多数食物和饮料生产商来说,监控他们的产品和/或工艺环境中好氧细菌的存在和数量是常规工作。

[0035] 用于测试好氧细菌的传统方法通常涉及在琼脂培养基或薄膜培养装置(诸如3M PETRIFILM好氧细菌计数板(3M PETRIFILM Aerobic Count Plate)(得自美国明尼苏达州圣保罗的3M公司(3M Company, St. Paul, MN)))上培养微生物。用于检测样本中的酵母和霉菌的薄膜培养装置在例如美国专利No. 4,565,783中有所描述。传统测试方法涉及将测试板温育至少2天以得到准确计数。因此完成对好氧细菌的测试所花的时间可能需要食物加工商保持食物产品至少约2-3天,以便确定食物产品是否含有在正常的储存和使用条件下数量大到足以不利地影响食物产品的品质和/或安全性的好氧细菌。

[0036] 一些培养基(包括用于3M PETRIFILM好氧细菌计数板(3M PETRIFILM Aerobic Count Plate)的培养基在内)包含至少一种指示剂(例如,氯化三苯基四唑),该指示剂由好氧细菌转化为可检测(例如,可通过光吸收、反射和/或荧光检测)产物(例如,甲臍)。授予Townsend和Chen的美国专利No. 6,387,650公开了用于检测测试样本中的细菌的组合物,其中该组合物包含三种酶底物,当这些酶底物被存在于细菌中的相应酶活性成分水解时,可引起或产生相同类型的可检测信号(例如,荧光),所述专利全文以引用方式并入本文。一种酶底物被糖苷酶酶活性成分水解,第二种酶底物被肽酶酶活性成分水解,第三种酶底物被磷酸酶酶活性成分水解。在该专利中,Townsend和Chen进一步描述了在培养装置中使用含有指示剂的培养基,从而使得能够计算测试样本中微生物的最大可能数(MPN)。

[0037] 在一个方面,本公开提供了一种用于检测样本中的好氧和/或耐氧细菌的培养装置。当与含水液体接触时,培养装置中的组分可协同作用,形成含水培养基,该培养基用于培养和任选地测定样本中的好氧和/或耐氧细菌。在任一实施方案中,本公开的培养基可为混合物,该混合物包含支持好氧或耐氧细菌生长所必需的所有或基本上所有营养物质。在一些实施方案中,支持好氧或耐氧细菌生长的一种或多种营养物质可在样本中提供。

[0038] 相比于本领域已知的其他装置和方法,本公开的培养装置提供了改进的检测能力

(即,检测时间更短、在一定温育期内检测更广泛的好氧和/或耐氧细菌)。在一些方面,本公开的培养装置与在美国专利No.4,565,783、No.5,089,413和No.5,681,712中公开的薄膜培养装置相关,这些专利的全文以引用方式并入本文。

[0039] 用于与本发明的培养装置一起使用的合适样本可获自或来源于多个源。术语“源”通常用来指需要测试好氧和耐氧细菌的食物或非食物。该源可以为固体、液体、半固体、凝胶状材料、气体(例如空气)以及它们的组合。在一些实施方案中,该源可由捕集元件(例如,滤膜、拭子、织物或海绵)提供,该捕集元件用于例如从所关注的表面或者从空气采集该源。在一些实施方案中,样本液体可包括捕集元件,该捕集元件可进一步被破碎分开(例如,在搅动或溶解过程中)以增强该源和任何所关注的微生物的回收。所关注的表面可包括多种表面的至少一部分,所述表面包括但不限于壁(包括门)、地板、天花板、排水沟、冷却系统、管道(例如空气管道)、通风孔、马桶座圈、把手、门把手、扶手、工作台面、桌面、用餐表面(例如盘子、碟子等)、工作表面、设备表面、服装等,以及它们的组合。该源的全部或一部分可用于所述方法中。当使用该源的一部分时,这有时可以称作该源的“样本”。然而,术语“样本”在本文中一般用来指从来源获取并被引入到测试装置中以进行微生物检测的那部分体积或质量的材料。

[0040] 术语“食物”通常用于指固体、液体(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。食物的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、谷类食物、面包)、罐装食物、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。

[0041] 参照图1至图2,本公开的装置100包括防水基底片10、覆盖片20和第一层12,该第一层包含基本上干燥的、冷水可溶的第一水凝胶形成组合物。基底片10具有第一主表面10a和与第一主表面相对的第二主表面10b。尽管基底片10、覆盖片20和第一层12可以任何合适的关系布置;图1示出了这些部件的优选布置方式,其中第一层12附着到并覆盖样本接收区30的至少一部分。在任一实施方案中,任选的第二层14可设置在基底片10与第一层12之间。在任一实施方案中,第二层可包含第一粘合剂组合物。在任一实施方案中,装置100还包括任选的隔片50。隔片50包括孔隙52,该孔隙限定样本接收区30的周边。

[0042] 样本接收区30占据基底片10与覆盖片20之间的区域。该区域可具有规则形状或不规则形状。在任一实施方案中,该区域体积可由隔片50的孔隙52限定。孔隙52可具有任何形状。样本接收区30(或孔隙52)的可用形状的非限制性示例包括正方形、矩形、圆形、椭圆形、多边形、六边形和八边形。

[0043] 样本接收区的面积可根据例如待沉积在该区域中的含水液体的体积选择。在任一实施方案中,对于0.5-3毫升体积的含水液体,样本接收区的面积为约 10cm^2 。在任一实施方案中,对于0.5-3毫升体积的含水液体,样本接收区的面积为约 15cm^2 。在任一实施方案中,对于1-5毫升体积的含水液体,样本接收区的面积为约 20cm^2 。在任一实施方案中,对于1-5毫升体积的含水液体,样本接收区的面积为约 25cm^2 。在任一实施方案中,对于1-5毫升体积的含水液体,样本接收区的面积为约 30cm^2 。在任一实施方案中,对于1-5毫升体积的含水液体,样本接收区的面积为约 31cm^2 。在任一实施方案中,对于1-5毫升体积的含水液体,样本接收区的面积为约 $25-35\text{cm}^2$ 。

[0044] 如果存在的话,第一层12被固定到基底片10的一部分和/或第二层14的一部分。第一层12覆盖装置100的样本接收区30的至少一部分。在装运、储存和温育期间用于覆盖第一层12的覆盖片20也在图1和2中示出为以类似铰链方式沿隔片50的一个边缘附接。覆盖片20可通过任何合适的方式附接,所述方式包括例如双面粘合带56,如图2所示。合适的基底片10、第一水凝胶形成组合物的部件和覆盖片20包括美国专利No.4,565,783中所述的那些,该专利全文以引用方式并入本文。在装置100与预定量的含水液体水合之后,第一层12的至少一部分与样本接收区30流体连通。

[0045] 基底片10可为相对坚硬的膜(例如聚酯、聚丙烯或聚苯乙烯),或相对坚硬的纸材或其上具有防水涂层的硬纸板,其不会吸水或者以别的方式被水影响。约100 μ m至180 μ m厚的聚酯膜、约100 μ m至200 μ m厚的聚丙烯膜和约300 μ m至380 μ m厚的聚苯乙烯膜是基底片10的合适材料的非限制性示例。基底片10可为透明的或不透明的,具体取决于是否想要通过该基底片观察微生物菌落。为有利于微生物菌落的计数,基底片10可任选地在其上印刷有网格图案(例如方格,未示出)。

[0046] 第二层14中的第一粘合剂组合物优选地对压力敏感、不溶于水且基本上不抑制预期微生物的生长,如美国专利No.4,565,783中所述。在任一实施方案中,第二层可被涂覆到合适的基底片(例如,使用刮刀涂布机)上。优选地,当润湿时,第一粘合剂组合物是基本上透明的以允许观察微生物菌落。在装置100与预定量的含水液体水合之后,第二层14的至少一部分与样本接收区30流体连通。

[0047] 重新参照图1至图2,第一层12直接或间接附着到基底片10的至少一部分(例如,在样本接收区30的至少一部分中)。第一层12包含基本上不含水、冷水可溶的第一水凝胶形成组合物。在任一实施方案中,第一层12的一部分或整体可直接附着到基底片10(例如,基底片10的第一面10a)。在任一实施方案中,如果存在的话,第一层12的一部分或整体可附着到第二层14。第一水凝胶形成组合物可溶解到和/或悬浮在含水液体(例如,去离子水)中,然后被涂覆到基底片10上,接着可将其干燥直至其基本上不含水,例如美国专利No.4,565,783中所述。

[0048] 第一层12的第一水凝胶形成组合物包含至少一种冷水可溶性胶凝剂。如上文所指出的那样,第一组合物可仅包含胶凝剂,并且不含有营养物质。任选地,在任一实施方案中,第一水凝胶形成组合物还可包含有效量的营养物质以利于好氧细菌和/或耐氧细菌的生长。

[0049] 第一水凝胶形成组合物中使用的合适胶凝剂包括冷水可溶的天然胶凝剂与合成胶凝剂。合适的天然胶凝剂的非限制性示例包括褐藻胶、羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、刺槐豆胶、黄原胶。合适的合成胶凝剂包括例如聚丙烯酰胺。可设想天然胶凝剂和/或合成胶凝剂的组合。优选的胶凝剂包括瓜尔胶、黄原胶和刺槐豆胶,这些胶凝剂可单独使用,或在任一实施方案中彼此组合使用。冷水可溶的第一水凝胶形成组合物和/或第二水凝胶形成组合物的均匀单层是所期望的,其具有足够的暴露的表面积以便水化。在任一实施方案中,第一和/或第二水凝胶形成组合物包含胶凝剂的混合物。在任一实施方案中,该混合物包含瓜尔胶和黄原胶。在任一实施方案中,该混合物可包含质量比为约1:1的瓜尔胶和黄原胶。令人惊讶的是,通过某些微生物(例如,某些芽孢杆菌(*Bacillus*)菌种)可基本上阻止包含质量比为1:1的瓜尔胶与黄原胶的胶凝剂混合物液化,这些微生物产生一种液化(即,水解)

瓜尔胶的酶。

[0050] 第一层12的第一水凝胶形成组合物优选地包含冷水可溶的胶凝剂,该胶凝剂的量使得被放入样本接收区30的预定量的水或含水样本(例如,1至3ml)将形成具有合适粘度的水凝胶,例如在25℃下用Brookfield L VF型粘度计以60rpm测量时,粘度为约1500cps或更大。这种粘度的水凝胶可便于温育期间处理并堆叠培养装置100,并且支持水凝胶中形成清晰的菌落。例如,将0.025g至0.050g粉末状瓜尔胶在20.3cm²的面积上基本上均匀地铺展开后,在用1至3ml含水样本复水时,这些粉末状瓜尔胶便会提供足够粘稠的培养基。样本接收区每单位面积上适量的胶凝剂(例如,瓜尔胶)在例如美国专利No.5,089,413中有所论述。

[0051] 在任一实施方案中,第一水凝胶形成组合物还包含至少一种营养物质,以利于好氧细菌和/或耐氧细菌的生长。在任一实施方案中,第一水凝胶形成组合物包含多种营养物质,以利于好氧细菌和/或耐氧细菌的生长。有利于好氧细菌和/或耐氧细菌生长的合适营养物质是本领域的普通技术人员已知的。在任一实施方案中,第一水凝胶形成组合物可包含一种或多种这类营养物质。

[0052] 包含营养物质以利于好氧细菌和耐氧细菌生长和繁殖的培养基(例如,脱水粉末状培养基)是本领域已知的。培养基的组分包含例如:氮源(例如,酵母提取物、肉或其他蛋白质的酶消化物、麦芽提取物);碳源(例如,各种糖、多糖、低聚糖、其他碳水化合物);一种或多种无机盐(例如,氯化钙、柠檬酸铁铵、硫酸镁、氯化锰、硫酸锌);以及任选的缓冲剂。鉴于本公开,本领域的普通技术人员将认识到,多种营养物质组合物可与本公开的酶底物指示剂一起使用来检测好氧细菌和耐氧细菌,前提条件是营养物质组合物的组分不显著抑制酶底物的水解,并且营养物质组合物的组分不显著屏蔽(例如,通过荧光淬灭)用作指示剂的酶底物的产物。

[0053] 在任一实施方案中,培养装置可包含营养物质,所述营养物质包括蛋白质、低聚肽和/或氨基酸。这种营养物质的非限制性示例包括酵母提取物(例如,酵母自溶物)和蛋白质消化物。有利于好氧细菌和/或耐氧细菌生长的合适营养物质的非限制性示例示于表1中。第一水凝胶形成组合物在装置100中可作为粉末(或凝聚的粉末)涂料或作为干燥的液体涂料提供。用于制备这种粉末涂料和液体涂料,以及用于将这些涂料粘附到基底片的方法是本领域已知的,并且可见于例如美国专利No.4,565,783、No.5,601,998、No.5,364,766和No.5,681,712中,这些专利中的每一篇全文以引用方式并入本文。

[0054] 表1有利于好氧细菌和/或耐氧细菌生长的示例性营养物质列表

[0055]	葡萄糖
	丙酮酸盐
	琥珀酸盐
	酪蛋白水解物
	脑心浸液
	肉蛋白胨
	蛋白质水解物
	胰蛋白胨
	酵母自溶物

酵母提取物
植物蛋白胨
肉提取物
胰蛋白胨

[0056] 现在已知的是，L-精氨酸、脱脂乳和D-海藻糖中至少一种或任两种或更多种的组合可利于某些好氧细菌或耐氧细菌在约22-26小时的温育期内的生长和检测。因此，在任一实施方案中，本公开的培养装置可任选地包含L-精氨酸、脱脂乳、D-海藻糖或前述营养物质的任两种或更多种的组合。在任一实施方案中，L-精氨酸可以干固体的约0.2%-0.6%（例如，约0.5%）的浓度存在于本公开的培养装置中的干燥涂料（例如，第一水凝胶形成组合物）中。在任一实施方案中，脱脂乳可以干固体的约0.5%-3.0%（例如，约1.2%）的浓度存在于本公开的培养装置中的干燥涂料（例如，第一水凝胶形成组合物）中。在任一实施方案中，D-海藻糖可以干固体的约0.5%-2.0%（例如，约1.2%）的浓度存在于本公开的培养装置中的干燥涂料（例如，第一水凝胶形成组合物）中。在任一实施方案中，L-精氨酸、脱脂乳和D-海藻糖可累计以干固体的小于或等于约5%的浓度存在于本公开的培养装置中的干燥涂料（例如，第一水凝胶形成组合物）中。

[0057] 在任一实施方案中，培养装置可包含缓冲剂。该缓冲剂可在第一和/或第二水凝胶形成组合物中提供。合适的缓冲剂的非限制性示例包括蛋白质、磷酸盐化合物（例如，磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾）、碳酸钠、MOPS（2-[N-吗啉]乙磺酸）游离酸和MOPS钠盐。

[0058] 本公开的培养装置可包含一种或多种无机元素，以利于好氧细菌或耐氧细菌的生长。这些无机元素包括下列的任一种或多种（只要尚未在营养物质的各种组分的上述源中提供）：钙、氯、钴、铁、锰、磷、钾、硫、钠、锡和锌。可提供盐类作为离子源。盐类可包括磷酸钾、硫酸镁、氯化钠、氯化钙、硼酸、硫酸铜、碘化钾、氯化铁、硫酸锰、钼酸钠和硫酸锌。如果存在的话，无机元素（一种或多种）和/或盐（一种或多种）可在第一水凝胶形成组合物和/或第二水凝胶形成组合物中提供。

[0059] 表2示出了有利于好氧细菌和耐氧细菌生长的营养物质混合物的一个实施方案。其他本领域已知的营养物质混合物可用于本公开的培养装置中，以利于好氧细菌或耐氧细菌的生长。

[0060] 表2用于促进好氧细菌或耐氧细菌生长的营养物质混合物

[0061]	肉胨(猪肉)
	大豆蛋白胨
	胰蛋白胨
	酵母提取物
	丙酮酸
	磷酸钾(一元)
	磷酸钾(二元)
	右旋糖
	硫酸镁(七水合物)
	氯化钙

氯化锰
碳酸钠
硫酸锌(七水合物)

[0062] 覆盖片20直接或间接附接到基底片10。覆盖片20具有第一主表面20a和与第一主表面相对的第二主表面20b。在任一实施方案中,覆盖片20的一部分(例如,沿边缘的一部分)可(例如,经由热密封或双面胶带56)直接附连到基底片10的一部分(例如,沿一个边缘的一部分)。另选地或除此之外,覆盖片20的一部分可附接到层(例如,第一层12和/或第二层14),该层直接或间接附着到基底片10。

[0063] 覆盖片20的尺寸被设计为覆盖设置在基底片10与覆盖片20之间的样本接收区。因此,覆盖片20优选地与基底片10具有大致相同的尺寸和形状。在任一实施方案中,覆盖片20可包括延伸到基底片10的边缘之外的凸片27。在任一实施方案中,凸片27可靠近基底片10的边缘,该边缘与覆盖片20连接到基底片10的边缘相对,如图1所示。在使用中,凸片27可被抓握以便抬起覆盖片20的一部分使其远离基底片10,从而使样本沉积在样本接收区30中。

[0064] 覆盖片20为半透明或优选透明的以有利于对菌落进行计数,并且是微生物和水蒸汽均基本上不可渗透的。一般来讲,覆盖片20与基底片10具有相同的特性,诸如透明性和优选不透水性。此外,覆盖片20可在其上印刷有图案,诸如正方形网格图案或边框(未示出)以有助于细菌菌落计数,从而实现用于放置含水测试样本和/或实现美观效果的目标。可选择覆盖片20以提供好氧细菌所必需的一定的透氧量,一些好氧细菌可优选相对富氧环境为最佳生长条件。合适的覆盖片材料在美国专利No.5,681,712中有所公开。

[0065] 在任一实施方案中,覆盖片20可未涂覆任何涂层,或覆盖片的一部分可涂覆有第二粘合剂组合物的第三层22(例如,在面向基底片10的主表面上),以便利于将覆盖片20密封到第一层12上。此外,覆盖片20或第三层22的一部分可任选地涂覆有包含第二水凝胶形成组合物的第四层24(例如,在面向基底片10的主表面上)。

[0066] 在任一实施方案中,第三层22的第二粘合剂组合物可与第一粘合剂组合物相同或不同。在任一实施方案中,第二水凝胶形成组合物可包含与第一水凝胶形成组合物相同或不同的组分。覆盖片20上的涂层可覆盖整个面向基底片10的表面,但优选覆盖至少与样本接收区30流体连通的表面部分。若希望为装置提供的胶凝剂比可被掺入单独的第一水凝胶形成组合物中的多,则这种带涂层的覆盖片尤其优选。在装置100与预定量的含水液体水合之后,第三层22(如果存在的话)和第四层(如果存在的话)的至少一部分与样本接收区30流体连通。

[0067] 图3示出了培养装置100的俯视图,并突出显示样本接收区30。尽管样本可沉积到培养装置100中样本接收区30的任一部分中,但优选地是,样本沉积到样本接收区的中心区域附近。

[0068] 第四层24包含基本上不含水、冷水可溶的第二水凝胶形成组合物。在任一实施方案中,第四层24的第二水凝胶形成组合物包含一种或多种如本文所公开的冷水可溶性胶凝剂(例如,瓜尔胶)。在任一实施方案中,第二水凝胶形成组合物还可包含有效量的一种或多种本文所公开的营养物质(例如,胰蛋白胨),以利于好氧细菌或耐氧细菌生长。在任一实施方案中,第二水凝胶形成组合物可包含一种或多种如本文所公开的指示剂(例如,3-吡啶羧基磷酸酯)。在任一实施方案中,第二水凝胶形成组合物包含至少一种冷水可溶性胶凝剂,

以及一种或多种指示剂,或一种或多种营养物质。在任一实施方案中,第二水凝胶形成组合物可作为粉末或凝聚的粉末被施加到包含第二粘合剂组合物的第三层22,例如美国专利No.4,565,783中所述。

[0069] 在任一实施方案中,第四层24的第二水凝胶形成组合物可作为基本上干燥的粉末(或凝聚的粉末)涂料被施加到第三层22。用于制备和施用这种粉末涂料的合适方法在美国专利No.4,565,783中有所描述。

[0070] 在使用中,含水液体(例如,样本材料和/或样本悬浮培养基诸如水、缓冲液或营养培养基)被沉积到培养装置100的样本接收区30中。当含水液体接触胶凝剂(例如,在第一水凝胶形成组合物中的胶凝剂和/或在第二水凝胶形成组合物中的胶凝剂(如果存在的话))时,液体与胶凝剂在样本接收区中结合形成水凝胶。所得水凝胶提供含水环境,以利于好氧和/或耐氧细菌菌落的生长和检测。

[0071] 第一粘合剂组合物和第二粘合剂组合物(如果存在的话)优选为压敏粘合剂。更优选的是,粘合剂为压敏粘合剂,诸如包含丙烯酸烷基酯单体和烷基酰胺单体的共聚物的水不溶性粘合剂。优选的是,这些共聚物中丙烯酸烷基酯单体与烷基酰胺单体的重量比为约90:10至99:1,更优选为94:6至98:2。丙烯酸烷基酯单体包含丙烯酸的低级烷基(C2至C10)单体,其包括例如,丙烯酸异辛酯(I0A)、丙烯酸2-乙基己酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸异戊酯以及它们的混合物;同时烷基酰胺单体可包括但不限于,丙烯酰胺(ACM)、甲基丙烯酰胺、N-乙基吡咯烷酮(NVP)、N-乙基己内酰胺(NVCL)、N-乙基-2-哌啶、N-(单或二低级烷基(C2至C5)) (甲基) 丙烯酰胺、N-甲基(甲基) 丙烯酰胺、N,N-二甲基(甲基) 丙烯酰胺或它们的混合物。

[0072] 在任一实施方案中,第一粘合剂组合物和/或第二粘合剂组合物可包含指示剂。在任一实施方案中,指示剂可溶解在有机溶剂(例如,甲醇)中,并在将粘合剂组合物施用到基底片10和/或覆盖片20之前与该组合物共混。在任一实施方案中,第一粘合剂组合物和/或第二粘合剂组合物可包含多种如本文所论述的指示剂。在任一实施方案中,第一粘合剂组合物和第二粘合剂组合物各自可包含相同的指示剂。在任一实施方案中,第一粘合剂组合物和第二粘合剂组合物各自可包含未包含在另一粘合剂组合物中的指示剂。

[0073] 在任一实施方案中,第一水凝胶形成组合物和/或第二水凝胶形成组合物可包含指示剂。在任一实施方案中,第一水凝胶形成组合物包含至少一种指示剂,第二水凝胶形成组合物可包含至少一种指示剂。

[0074] 本公开的培养装置100包含多种用于检测好氧细菌或耐氧细菌的存在的指示剂。在任一实施方案中,合适的指示剂包括例如酶底物。在任一实施方案中,每种指示剂可包含报告基团(例如,荧光底物基团或生色底物基团),该基团允许检测指示剂和生物活性成分(即,与好氧细菌或耐氧细菌相关的酶活性成分)之间的反应。在任一实施方案中,所述多种指示剂可包括五种指示剂。在任一实施方案中,上述五种指示剂可包括用于检测三种不同的糖苷酶酶活性成分的三种指示剂、用于检测酯酶酶活性成分的一种指示剂(例如,烷基酯酶酶活性成分)和用于检测磷酸酶酶活性成分的一种指示剂。

[0075] 好氧和/或耐氧细菌菌种可产生一种或多种糖苷酶酶活性成分,每种糖苷酶酶活性成分均能够与指示剂反应产生可检测产物。表3和4列出在好氧细菌或耐氧细菌菌落内或其附近可与相应酶活性成分反应的指示剂(如果存在的话)的非限制性示例。

[0076] 表3用于检测糖苷酶活性成分的指示剂。

[0077]

4-甲基伞形酮基-N-乙酸- β -D-氨基半乳糖苷	4-甲基伞形酮基- β -D-木糖	4-硝基苯基- β -D-吡喃岩藻糖苷
4-甲基伞形酮基-N-乙酸- $\delta\beta$ -D-氨基葡萄糖苷	6-溴-2-萘基-N-乙酰基- β -D-氨基葡萄糖苷	2-硝基苯基- β -D-硫代半乳糖苷
2'-(4-甲基伞形酮基- α -D-N-乙酰基-神经氨酸钠盐	6-溴-2-萘基- α -D-吡喃葡萄糖苷	酚酞-单- β -D-吡喃半乳糖苷
4-甲基伞形酮基- α -L-吡喃阿拉伯糖苷	6-溴-2-萘基- β -D-吡喃木糖苷	5-溴-4-氯-3-吡啶基-N-乙酰基- β -D-氨基半乳糖苷
4-甲基伞形酮基- β -D-吡喃纤维二糖苷	萘酚 AS-BI- β -L-吡喃岩藻糖苷	5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-吡喃岩藻糖苷
4-甲基伞形酮基- β -D-岩藻糖苷	1-萘基- α -D-吡喃半乳糖苷	吡啶氧基- β -D-半乳糖苷
4-甲基伞形酮基- α -D-甘露糖苷	2-硝基苯基-N-乙酰基- α -D-氨基半乳糖苷	4-硝基苯基- α -L-吡喃岩藻糖苷
4-甲基伞形酮基-6-磺基-N-乙酰基- β -D-氨基葡萄糖苷	4-硝基苯基- β -D-纤维二糖苷	4-硝基苯基- β -L-吡喃岩藻糖苷
4-甲基伞形酮基- β -D-纤维三糖	6-溴-2-萘基- β -D-半乳糖苷	2-硝基苯基- α -D-吡喃半乳糖苷
4-甲基伞形酮基- β -D-N,N'-二乙酰基-壳二糖苷	6-溴-2-萘基- β -D-吡喃葡萄糖苷	2-硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷
4-甲基伞形酮基- α -L-岩藻糖苷	6-溴-2-萘基- β -D-葡萄糖醛酸苷	3-硝基苯基- α -D-吡喃半乳糖苷
4-甲基伞形酮基- β -L-岩藻糖苷	2-氯-4-硝基苯基-N-乙酰基- β -D-氨基葡萄糖苷	3-硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷
4-甲基伞形酮基- α -D-半乳糖苷	2-氯-4-硝基苯基- β -D-纤维二糖苷	4-硝基苯基- α -D-吡喃半乳糖苷
4-甲基伞形酮基- β -D-半乳糖苷	2-氯-4-硝基苯基- β -D-吡喃木糖苷	4-硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷

[0078]

4-甲基伞形酮基- β -D-半乳糖苷-6-磷酸铵盐	β -羟基喹啉- β -D-葡萄糖苷酸	4-硝基苯基 1- β -D-半乳糖醛酸苷
4-甲基伞形酮基- α -D-葡萄糖苷	萘酚 AS-BI δ - β -D-吡喃半乳糖苷	4-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷
4-甲基伞形酮基- β -D-葡萄糖苷	萘酚 AS-BI δ - β -D-氨基半乳糖苷	4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷
4-甲基伞形酮基- β -D-葡萄糖苷酸	萘酚 AS-BI δ -吡喃葡萄糖苷	4-硝基苯基- β -D-葡萄糖苷酸
4-甲基伞形酮基- β -D-N,N',N'-三乙酰壳三糖糖苷	萘酚 AS-BI δ - β -D-葡萄糖醛酸	2-硝基苯基- β -D-葡萄糖苷酸
5-溴-4-氯-3-吡啶基- α -D-吡喃半乳糖苷	1-萘基- β -D-吡喃半乳糖苷	4-硝基苯基- β -D-葡萄糖苷酸
4-硝基苯基-N-乙酰基-1-硫代- β -D-氨基葡萄糖苷	2-萘基- β -D-吡喃半乳糖苷	4-硝基苯基- β -D-硫代半乳糖苷
4-硝基苯基- α -L-吡喃阿拉伯糖苷	1-萘基- β -D-葡萄糖苷酸	4-硝基苯基- β -D-硫代吡喃葡萄糖苷
3-硝基苯基- β -D-吡喃岩藻糖苷	4-硝基苯基 1-N-乙酰基- α -D-氨基半乳糖苷	酚酞- β -D-葡萄糖醛酸钠盐
4-硝基苯基- α -D-吡喃岩藻糖苷	4-硝基苯基 1-N-乙酰基- β -D-氨基半乳糖苷	苯基-N-乙酰基- α -D-氨基葡萄糖苷
5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-吡喃葡萄糖苷	4-硝基苯基-N-乙酰基- α -D-氨基葡萄糖苷	苯乙基- β -D-半乳糖苷
5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-葡萄糖醛酸环己基铵盐	4-硝基苯基-N-乙酰基- β -D-氨基葡萄糖苷	苯基- β -D-半乳糖苷
5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-葡萄糖醛酸钠盐	吡啶氧基- β -D-葡萄糖苷	苯基- α -D-葡萄糖苷
5-溴-4-氯-3-吡啶基- α -D-吡喃甘露糖苷	吡啶氧基- β -D-葡萄糖醛酸环己基铵盐	5-溴-4-氯-3-吡啶基-N-乙酰基- β -D-氨基葡萄糖苷
5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-吡喃半乳糖苷	5-溴-4-氯-3-吡啶基- α -D-吡喃葡萄糖苷	

[0079]	ALDOL 467 β -D-氨基葡萄糖苷	ALDOL 470 α -D-吡喃葡萄糖苷	ALDOL 470 β -D-吡喃半乳糖苷
	ALDOL 518 β -D-吡喃半乳糖苷	ALDOL 467 β -D-吡喃半乳糖苷	ALDOL 458 β -D-吡喃半乳糖苷

[0080] 好氧细菌或耐氧细菌的菌种可产生多种酯酶酶活性成分,其包括例如,烷基酯酶(例如,脂肪酸烷基酯酶)活性成分和磷酸酶(例如,磷酸单酯水解酶)活性成分。表4列出在好氧细菌或耐氧细菌菌落内或其附近可与相应酯酶酶活性成分反应的指示剂(如果存在的话)的非限制性示例。

[0081] 表4用于检测烷基酯酶和磷酸酶酶活性成分的指示剂

[0082]

烷基酯酶底物	磷酸酯酶底物
4-甲基伞形酮基-乙酸酯	双(4-甲基伞形酮基)-磷酸酯
4-甲基伞形酮基-丁酸酯	双(4-甲基伞形酮基)-磷酸钠盐
4-甲基伞形酮基-月桂酸酯	4-甲基伞形酮基-磷酸酯(游离酸)
4-甲基伞形酮基-壬酸酯	4-甲基伞形酮基-磷酸二环己基铵盐
4-甲基伞形酮基-油酸酯	4-甲基伞形酮基-磷酸二钠盐
4-甲基伞形酮基-棕榈酸酯	双(4-硝基苯基)磷酸钠盐
4-甲基伞形酮基-丙酸酯	萘酚 AS-磷酸酯
4-甲基伞形酮基-硬脂酸酯	萘酚 AS-磷酸钠盐
6-溴-2-萘基乙酸酯	1-萘基磷酸二钠盐
萘酚 AS-乙酸酯	2-萘基磷酸二钠盐
萘酚 AS-壬酸酯	2-萘基磷酸钠盐
1-萘基丁酸酯	2-萘基磷酸钠盐
2-萘基丁酸酯	1-萘基磷酸钠盐
1-萘基辛酸酯	二磷酸酚酞
2-萘基辛酸酯	酚酞二磷酸四钠盐
2-硝基苯基-乙酸酯	5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸二钠盐
4-硝基苯基-乙酸酯	5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸钾盐
2-硝基苯基-丁酸酯	5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸酯对甲苯胺盐
4-硝基苯基-丁酸酯	3-吡啶氧基-磷酸酯二(2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇)盐
4-硝基苯基-癸酸酯	3-吡啶氧基-磷酸二钠盐
4-硝基苯基-癸酸酯	3-吡啶氧基-磷酸酯对甲苯胺盐
3-硝基苯基-辛酸酯	ALDOL 470 磷酸二钠盐
4-硝基苯基-辛酸酯	ALDOL 458 磷酸二钠盐
2-硝基苯基-肉豆蔻酸酯	
4-硝基苯基-肉豆蔻酸酯	
2-硝基苯基-棕榈酸酯	
4-硝基苯基-棕榈酸酯	
4-硝基苯基-丙酸酯	

[0083]	4-硝基苯基-硬脂酸酯	
	5-溴-4-氯-3-吡啶基-乙酸酯	
	5-溴-4-氯-3-吡啶基-丁酸酯	
	5-溴-4-氯-3-吡啶基-辛酸酯	
	ALDOL 515 醋酸酯	
	ALDOL 470 醋酸酯	
	ALDOL 470 丁酸酯	
	ALDOL 470 壬酸酯	
	ALDOL 458 醋酸酯	

[0084] 在一个优选的实施方案中,本公开的培养装置包含用于检测 α -葡糖苷酶酶活性成分的指示剂、用于检测 β -葡糖苷酶酶活性成分的指示剂和用于检测 β -半乳糖苷酶酶活性成分的指示剂。在任一实施方案中,所有上述三种指示剂包含类似或相同的报告基团。在一个特别优选的实施方案中,本公开的培养装置包含5-溴-4-氯-3-吡啶基- α -D-吡喃葡糖苷、5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-吡喃葡糖苷和5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-吡喃半乳糖苷。在一个实施方案中,本公开的培养装置还包含氧化还原指示剂。合适的氧化还原指示剂的一个非限制性示例为氯化三苯基四唑。在任一实施方案中,氧化还原指示剂可被设置在第一粘合剂组合物和/或第二粘合剂组合物中。在任一实施方案中,多种酶底物指示剂可被设置在一个粘合剂组合物(例如,第一粘合剂组合物)中,氧化还原指示剂可被设置在另一个粘合剂组合物(例如,第二粘合剂组合物)中。

[0085] 合适的氧化还原指示剂(例如,氯化三苯基四唑)包含报告基团(例如,生色底物和/或荧光底物基团),该基团被氧化或还原后形成可检测信号(例如,可检测的颜色变化或荧光变化)。举例来说,氯化三苯基四唑被细菌还原,形成具有可检测颜色的甲臍产物。在本公开的培养装置中检测可检测的报告基团(例如,甲臍)可指示好氧细菌或耐氧细菌是否可能存在。

[0086] 根据本公开,所述多种指示剂可在培养装置100中在一个或多个设置在基底片10或覆盖片20上的层中提供。在任一实施方案中,一种或多种指示剂可在第一层12中提供。在这些实施方案中,至少一种指示剂可与冷水可溶性胶凝剂和第一水凝胶形成组合物的任选的营养物质混合,随后涂覆到基底片10的至少一部分(和/或第二层的一部分(如果存在的话))上。

[0087] 在任一实施方案中,一种或多种指示剂可在第二层14中提供。在这些实施方案中,至少一种指示剂可与第一粘合剂组合物的粘合剂混合,随后涂覆到基底片10的至少一部分上。

[0088] 在任一实施方案中,一种或多种指示剂可在第三层22中提供。在这些实施方案中,至少一种指示剂可与第二粘合剂组合物的粘合剂和任选的选择剂混合,随后涂覆到基底片20的至少一部分上。

[0089] 在任一实施方案中,一种或多种指示剂可在第四层24中提供。在这些实施方案中,

至少一种指示剂可与冷水可溶性胶凝剂和第二水凝胶形成组合物的任选的营养物质混合,随后涂覆到覆盖片20的至少一部分(和/或第三层22的一部分(如果存在的话))上。

[0090] 有利的是,当在至少一种粘合剂组合物中提供时,一种或多种指示剂可均匀地分布在培养装置的样本接收区30之内,并可在粘合剂组合物中以非常高的浓度提供。不受理论的束缚,据认为,指示剂可从相对疏水的粘合剂组合物有效分配到相对亲水的复水凝胶中,从而提供一致、均一浓度的指示剂,以便与培养装置中的好氧细菌或耐氧细菌(如果存在于样本中)反应。

[0091] 在任一实施方案中,第一和/或第二粘合剂组合物可包含多种指示剂(例如,至少五种指示剂)或其盐。所述多种指示剂(或其盐)可包括5-溴-4-氯-3-吡啶基乙酸酯、5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-吡喃半乳糖苷、5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷、5-溴-4-氯-3-吡啶基-α-D-吡喃葡萄糖苷、5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸酯对甲苯胺盐和TTC。本研究人员已经发现指示剂的这种特定组合对于检测至少一种下述生物体(例如,属于假单胞菌属和乳酸菌菌群的微生物)具有令人惊讶的效果:这些生物体不能使用类似的仅具有生色酶底物或氧化还原底物的培养装置以其他方式被检测出来,这表明此组合可能具有协同效应。

[0092] 在任一实施方案中,第一和/或第二粘合剂组合物累计可包含约0.05-1.0重量%的5-溴-4-氯-3-吡啶基乙酸酯、约0.05-1.0重量%的5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-吡喃半乳糖苷、0.05-1.0重量%的5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷、约0.05-1.0重量%的5-溴-4-氯-3-吡啶基-α-D-吡喃葡萄糖苷和/或约0.05-1.0重量%的5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸酯对甲苯胺盐。

[0093] 在任一实施方案中,第一和/或第二粘合剂组合物累计可包含约0.18-0.5重量%的5-溴-4-氯-3-吡啶基乙酸酯。在任一实施方案中,第一和/或第二粘合剂组合物累计可包含约0.34-0.72重量%的5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-吡喃半乳糖苷。在任一实施方案中,第一和/或第二粘合剂组合物累计可包含约0.34-0.72重量%的5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷。在任一实施方案中,第一和/或第二粘合剂组合物累计可包含约0.34-0.72重量%的5-溴-4-氯-3-吡啶基-α-D-吡喃葡萄糖苷。在任一实施方案中,第一和/或第二粘合剂组合物累计可包含约0.36-0.76重量%的5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸酯对甲苯胺盐。

[0094] 在任一实施方案中,第一和/或第二粘合剂组合物累计可包含约0.18-0.5重量%的5-溴-4-氯-3-吡啶基乙酸酯、约0.34-0.72重量%的5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-吡喃半乳糖苷、约0.34-0.72重量%的5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷、约0.34-0.72重量%的5-溴-4-氯-3-吡啶基-α-D-吡喃葡萄糖苷和约0.36-0.76重量%的5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸酯对甲苯胺盐。

[0095] 在任一实施方案中,第一和/或第二水凝胶形成组合物可仅含有胶凝剂,而不含营养物质或指示剂。在任一实施方案中,当给培养装置接种时,一种或多种有利于好氧细菌或耐氧细菌生长的营养物质可沉积到培养装置(例如,在样本接收区30中)的含水液体(例如,含水悬浮培养基或稀释液)中。

[0096] 如上所论述,本公开的任何培养装置中的第一和/或第二水凝胶形成组合物还可包含至少一种营养物质,以利于好氧细菌或耐氧细菌生长。好氧细菌和耐氧细菌菌种在新陈代谢和生态方面各不相同,因此可利用多种营养物质以支持其生长和繁殖。表5示出了包括根据本公开的好氧细菌和耐氧细菌的属的非限制性示例。

[0097] 表5好氧细菌和耐氧细菌的示例性属。

[0098]	产碱杆菌属 (Alkaligenes)
	芽孢杆菌属 (Bacillus)
	柠檬酸杆菌属 (Citrobacter)
	肠杆菌属 (Enterobacter)
	肠球菌属 (Enterococcus)
	埃希氏菌属 (Escherichia)
	嗜血杆菌属 (Haemophilus)
	库克氏菌属 (Kokuria)
	微杆菌属 (Microbacterium)
	变形杆菌属 (Proteus)
	假单胞菌属 (Pseudomonas)
	葡萄球菌 (Staphylococcus)
	链球菌 (Streptococcus)
	弧菌属 (Vibrio)
	耶尔森氏菌属 (Yersinia)

[0099] 在任一实施方案中,本公开的培养装置还包括有利于置于培养装置中的好氧细菌或耐氧细菌好氧生长的透气膜。图4至图6示出了包括透气膜32的培养装置200的一个实施方案。

[0100] 培养装置200包括基底片10、包含第一水凝胶形成组合物的第一层12和覆盖片20;它们各自如上文所述。覆盖片20直接或间接附接到基底片10,如上文所述。在任一实施方案中,培养装置200还包括任选的包含第一粘合剂组合物的第二层14和/或任选的包含第二粘合剂组合物的第三层22和/或任选的包含第二水凝胶形成组合物的第四层24;它们各自如上文所述。

[0101] 在任一实施方案中,透气膜32可(例如,通过粘合剂层16)附着到基底片10。粘合剂层16可包含第三粘合剂组合物。第三粘合剂组合物可包含与本文所述的第一或第二粘合剂组合物相同的粘合剂组分,并可通过例如刮刀涂布方法施加到基底片10。将微孔膜32固定到基底片10的方法应取决于第二层14中的粘合剂组合物的性质。如果例如粘合剂组合物是压敏的,则可将微孔膜32置于第二层14上,向下按压,从而附着在适当位置。在任一实施方案中,当润湿时,微孔膜32可为半透明或基本上透明的以允许观察微生物菌落。

[0102] 在图4至图6所例示的实施方案中,透气膜32经由粘合剂层16附着到基底片10。任选的第二层14设置在(例如,涂覆到)透气膜32的至少一部分(或全部)上。第二层14包含如本文所述的第一粘合剂组合物。第一粘合剂组合物可包含一种或多种如本文所述的指示剂。第一层12设置在(例如,涂覆到)第二层14的至少一部分(或全部)上。第一层12包含如本文所述的第一水凝胶形成组合物。

[0103] 不受理论的束缚,在该装置被接种之后,当覆盖片20处于适当位置时,透气膜32允许足够的空气供给到包含水凝胶形成组合物的第一层12中。在这种情况下,膜32可用于支持该装置中好氧微生物的生长。由于膜32具有透气性且在其边缘(一个或多个)处该膜基本上暴露于空气中,因此空气能够流入该膜的边缘(一个或多个),然后水平通过该膜到第一

层12中。通过评估膜的垂直空气渗透性(即,在与膜的上表面和下表面正交的方向上的渗透性)最便利地估计对于特定膜的空气水平通道。合适的透气膜32材料包括合成材料或天然材料的微孔膜和微孔非织造料片,这些材料在美国专利No.5,089,413中有所描述,该专利全文以引用方式并入本文。优选膜材料的一个非限制性示例为微孔聚烯烃膜(APTRA经典膜;美国马萨诸塞州韦斯特伯勒的RKW Danafilms公司(RKW Danafilms;Westborough, MA))。

[0104] 在任一实施方案中,透气膜32是基本上不透明的。在这些实施方案中,如果基底片10在其上设置(例如,印刷)有网格线,则当培养装置100受到面向覆盖片20的第一主表面20a的光源照射(即,“正面”照射)时,优选这些网格线是基本上不可见的。然而,还优选的是,当培养装置100受到面向基底片的第二主表面10b的光源照射(“反面”照射)时,设置在基底片10上的网格线(未示出)是基本上可见的。有利的是,透气膜32的这种构型提供鲜亮的菌落颜色,使得人操作者在环境光照度下易于目测计数菌落数量(即,当该装置“从顶部被照亮”时,网格不与任何菌落共混或使其模糊),同时当该装置“从背面被照亮”时,这种结构也提供网格(如果需要的话)以利于计数。

[0105] 透气膜32可为多种颜色中的任一种,前提条件是该颜色基本上不妨碍典型菌落颜色(即,绿、红、紫)的检测。优选浅色膜。在任一实施方案中,透气膜是白色的。在任一实施方案中,当透气膜与沉积到生长区的含水样本流体接触时,透气膜是白色的。

[0106] 在任一实施方案中,基底片10或膜32在其上印刷有可见的正方形网格图案,如美国专利No.4,565,783中所述,以有利于细菌菌落的计数。可使用多种技术来制备本公开的装置。一般来讲,本公开的装置可手工制造,也可利用如美国专利No.4,565,783中所述的常见实验室设备制造。

[0107] 在本公开的任一实施方案中,隔片50直接或间接地附着到基底片10。如图4至图6所示,培养装置200包括(例如,经由热粘结或压敏粘合剂)附接到基底片10的第一表面10a、第一层12和/或第二层14的隔片50。隔片50包含切穿其中心以暴露第一层12的孔隙(例如,圆形孔隙52)。孔隙52的壁提供了具有预定尺寸和形状的槽,其限制了培养装置200的样本接收区30。隔片50限制水凝胶发生以下水合:第一水凝胶形成组合物在样本接收区中与含水液体水合。孔隙52通常刻划出培养装置的生长区域。隔片52应足够厚以形成所需体积的槽,例如1、2或3毫升。闭孔聚乙烯泡沫或聚苯乙烯泡沫例如是用于隔片50的优选材料,但可以使用任何疏水性的(不可润湿的)、对微生物惰性的并且能够经受消毒的材料。在一些实施方案中(未显示),隔片可包括多个孔隙(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15或20个孔隙),每个孔隙可接种上不同的样本。

[0108] 用于隔片膜的合适材料为任何固体非抑制性天然或合成物质,该物质容易以片形式得到,但不是微生物生长位点。聚乙烯、聚丙烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯和聚苯乙烯是一些合适的合成材料示例。具体地讲,优选相对廉价、可商购获得的聚苯乙烯泡沫和聚乙烯泡沫。

[0109] 隔片50可包括相对较厚的设计,如美国专利No.5,681,712中所述的那些设计。较厚(例如,至少约0.5mm厚、约1mm厚、约1.5mm厚和约2mm厚)的开孔隔片50的一个目的是为了定位和保护膜(例如膜过滤器,未示出),该膜放置在与第一水凝胶形成组合物接触的隔片50的孔隙52中。在任一实施方案中,较厚的隔片50的另一个目的是为了减少或防止覆盖片

20与生长中的微生物菌落的接触(即提供生长表面和覆盖片20之间的“顶部空间”,这还可使得对生长中的好氧或耐氧微生物菌落的通气增加)。

[0110] 在包含隔片50的培养装置的任一实施方案中,覆盖片20优选以类似铰链方式沿隔片50的一个边缘附着。任选的是,覆盖片20涂覆有包含第二粘合剂组合物的第三层22和包含第二水凝胶形成组合物的第四层24,这两层各自如本文所述。在任一实施方案中,第二粘合剂组合物可包含用于好氧和/或耐氧细菌的所述多种指示剂中的一种或多种(例如,全部)。

[0111] 在另一方面,本公开提供了一种检测好氧细菌或耐氧细菌的方法。该方法包括将样本和含水液体在本公开培养装置的任一实施方案的样本接收区中接触以形成经接种的培养装置。在任一实施方案中,样本可包括含水液体。一般来讲,培养装置的样本接收区中胶凝剂、指示剂和营养物质(如果存在的话)的量被选择为当它们(即,胶凝剂、指示剂和营养物质)用预定体积(例如,1毫升、2毫升、5毫升)的含水液体复水时,能够为检测好氧细菌或耐氧细菌提供有效的浓度。在任一实施方案中,含水液体可与样本材料一起添加(例如,样本材料可被溶解、均化、悬浮和/或稀释在含水液体诸如例如无菌水、含水缓冲液或含水营养培养基中)。在任一实施方案中,其中样本包含固体材料(例如,在其上或其中具有保留材料的膜过滤器)或半固体材料,预定体积的液体(例如,无菌水、含水营养培养基)可用于在将固体或半固体样本用于接种培养装置之前或之后复水该装置。

[0112] 在所述方法的任一实施方案中,可以在将样本加入该装置之前、过程中或之后,将营养物质(例如,在水溶液中)加入该装置中。在任一实施方案中,营养物质可作为例如浓缩溶液加入,当该营养物质与样本和/或稀释液混合达到预定体积时,该营养物质在经接种的培养装置中被稀释到合适浓度。在任一实施方案中,加入培养装置中的营养物质可任选地包含L-精氨酸、脱脂乳、D-海藻糖或前述营养物质的任两种或更多种的组合。

[0113] 可采用本领域已知的方法(例如,通过倾倒或将液体样本移取到培养装置中)使样本与培养装置的样本接收区接触。在任一实施方案中,通常将覆盖片抬起以允许样本沉积在覆盖片和基底片之间;优选的是,沉积到培养装置中隔片的孔隙中(如果存在的话)。在任一实施方案中,将胶凝剂与样本和含水液体在样本接收区中接触,形成经接种的培养装置。在形成经接种的培养装置之后,放低覆盖片以在温育过程中形成对抗污染和/或防止含水液体过度蒸发的保护屏障。在任一实施方案中,样本可例如通过将加重板放在被覆盖装置的上表面而均匀铺展在整个生长区域。

[0114] 当使用不含如上所述带孔隙隔片的培养装置的实施方案时,可将模板(例如,限定生长区域的加重的圆形圈)暂时施加到覆盖片20的上表面,闭合之后,以限制培养基复水到由模板限定的生长区域(例如,样本接收区中心区域附近的5cm直径圆形生长区域)。

[0115] 在任一实施方案中,用培养装置的第一水凝胶形成组合物或第二水凝胶形成组合物接触样本包括将样本放置成与至少一种营养物质流体连通。这可以通过下列方式实现:将样本悬浮或稀释在包含营养物质的液体(例如,含水液体)中或用本文所述的包含至少一种营养物质的第一水凝胶形成组合物或第二水凝胶形成组合物接触样本和含水液体。因此,在任一实施方案中,用培养装置中的第一水凝胶形成组合物或第二水凝胶形成组合物接触样本材料包括将该样本放置成与营养物质流体连通以利于好氧细菌或耐氧细菌生长。

[0116] 在任一实施方案中,所述方法还包括温育(例如,在温度受控环境室中)经接种的

培养装置一段时间。温育条件(例如,温育温度)可影响样本中存在的好氧和/或耐氧细菌的生长速度。本领域的普通技术人员将认识到检测特定好氧和/或耐氧细菌的合适的温育温度。本公开的经接种的培养装置可例如在约25℃至约42℃之间(例如包括约25℃和约42℃)的温度下温育。在任一实施方案中,培养装置可在有氧(例如,正常大气)气体环境下温育。

[0117] 将经接种的培养装置温育一段足够使好氧和/或耐氧细菌生长的时间。在任一实施方案中,该时间段可为约22小时至约72小时(包括约22小时和约72小时)。在任一实施方案中,该时间段可为约22小时至约48小时(包括约22小时和约48小时)。在任一实施方案中,该时间段可为约22小时至约36小时(包括约22小时和约36小时)。在任一实施方案中,该时间段可为约22小时至约26小时(包括约22小时和约26小时)。在任一实施方案中,该时间段可为约24小时。在任一实施方案中,该时间段可为最多至约48小时。在任一实施方案中,该时间段可为最多至约24小时。

[0118] 本公开的方法还包括检测培养装置中的好氧细菌或耐氧细菌菌落(例如,观察培养装置中的好氧和/或耐氧细菌菌落)。在任一实施方案中,检测培养装置中的好氧细菌和/或耐氧细菌菌落可包括检测培养装置中是否存在或不存在所述指示剂中至少一种的可检测报告基团,其中检测是否存在可检测报告基团可指示好氧细菌和/或耐氧细菌是否存在。当好氧和/或耐氧细菌菌落在本公开的培养装置中生长时,该菌落中的细胞与一种或多种指示剂反应以(例如,通过生色酶底物或荧光酶底物的水解)活化报告基团,从而直接或间接使报告基团可被检测出。就生色底物指示剂而言,报告基团可通过光所吸收和/或反射的特征波长而被检测出来。例如,包含吲哚基报告基团的指示剂可二聚形成靛蓝或其衍生物。因此,具有与特定报告基团相关的颜色(例如,菌落具有该颜色或菌落附近的水凝胶具有该颜色)的菌落的存在可指示好氧和/或耐氧细菌菌落的存在。

[0119] 就荧光底物指示剂而言,可检测报告基团可通过下列方式观察到:用合适波长(例如,约365nm以检测含4-甲基伞形酮的报告基团)的光照射培养装置,并观察由该报告基团发出的光。本领域的普通技术人员将认识到需要分别用合适的波长的光照射培养装置以检测与特定荧光底物指示剂相关的报告基团。具有荧光报告基团颜色的菌落或该菌落附近的水凝胶中荧光报告基团的存在指示该菌落包含好氧和/或耐氧细菌。

[0120] 在任一实施方案中,检测报告基团可包括从视觉上观察培养装置。在任一实施方案中,检测报告基团可包括获得培养装置的图像,然后从视觉上观察该图像或使用自动图像分析技术分析该图像。用于自动检测培养装置中的微生物菌落的方法和装置在例如美国专利No.5,448,652、No.6,058,209、No.6,243,486、No.6,271,022、No.7,298,885和No.7,319,031中有所描述,这些专利全文均以引用方式并入本文。

[0121] 在任一实施方案中,本公开的方法还包括在温育经接种的培养装置之后,计数经接种的培养装置中存在的好氧和/或耐氧细菌菌落。因此,在如本文所述那样检测出好氧和/或耐氧细菌菌落之后,手动或使用本领域已知的自动化方法确定检测的菌落的数量。

[0122] 示例性实施方案

[0123] 实施方案A为一种用于培养和检测微生物的装置,该装置包括:

[0124] 具有第一主表面和第二主表面的自支撑基底片;

[0125] 附接到基底片的覆盖片;

[0126] 设置在基底片与覆盖片之间的样本接收区;

[0127] 第一层,其包含附着到基底片的第一主表面的基本上干燥的、冷水可溶的第一水凝胶形成组合物;以及

[0128] 多种指示剂,所述多种指示剂包括:

[0129] 用于检测不同糖苷酶活性成分的三种指示剂;

[0130] 用于检测烷基酯酶活性成分的指示剂;

[0131] 用于检测磷酸酶活性成分的指示剂;

[0132] 包含四唑鎓染料的氧化还原指示剂;

[0133] 其中所述多种指示剂中的每种包含可检测报告基团;

[0134] 其中所述多种指示剂中的每种设置在附着到基底片或覆盖片的至少一个层中,其中当预定体积的含水液体沉积在样本接收区中时,所述至少一个层与样本接收区流体连通。

[0135] 实施方案B为实施方案A的装置,该装置还包括第二层,该第二层包含设置在基底片与第一层之间的第一粘合剂组合物。

[0136] 实施方案C为实施方案A或实施方案B的装置,该装置还包括附着到基底片的透气膜。

[0137] 实施方案D为实施方案C的装置,其中透气膜设置在基底片与第一层之间。

[0138] 实施方案E为实施方案C的装置,其中透气膜是基本上不透明的。

[0139] 实施方案F为实施方案C或实施方案D的装置,其中透气膜基本上不含可见标记。

[0140] 实施方案G为前述实施方案中任一项的装置,其中第一水凝胶形成组合物还包含营养物质以利于好氧细菌的生长,其中第一水凝胶形成组合物附着到基底片或覆盖片的至少一部分,其中该部分与样本接收区流体连通。

[0141] 实施方案H为前述实施方案中任一项的装置,其中覆盖片包括第一主表面,其中覆盖片的第一主表面面向基底片的第一主表面,其中培养装置还包括:

[0142] 包含第二粘合剂组合物的第三层,其中第三层附着到覆盖片的一部分;以及

[0143] 包含基本上干燥的、冷水可溶的第二水凝胶形成组合物的第四层,其中第四层附着到第三层。

[0144] 实施方案I为前述实施方案中任一项的装置,其中所述多种指示剂中至少一种设置在第一粘合剂组合物、第二粘合剂组合物、第一水凝胶形成组合物和/或第二水凝胶形成组合物中。

[0145] 实施方案J为实施方案I的装置,其中所述多种指示剂中至少三种指示剂设置在第一粘合剂组合物和/或第二粘合剂组合物中。

[0146] 实施方案K为前述实施方案中任一项的装置,其中第一水凝胶形成组合物和/或第二水凝胶形成组合物包含胶凝剂的混合物。

[0147] 实施方案L为实施方案K的装置,其中胶凝剂的混合物包含质量比为约1:1的黄原胶和瓜尔胶。

[0148] 实施方案M为前述实施方案中任一项的装置,其中用于检测不同糖苷酶活性成分的至少三种酶活性成分指示剂包括检测 α -葡萄糖苷酶活性成分的化合物、检测 β -葡萄糖苷酶活性成分的化合物和检测 β -半乳糖苷酶活性成分的化合物。

[0149] 实施方案N为实施方案M的装置,其中用于检测不同糖苷酶活性成分的至少三种

酶活性成分指示剂包括5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-吡喃半乳糖苷或其盐、5-溴-4-氯-3-吡啶基-α-D-吡喃葡萄糖苷或其盐以及5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷或其盐。

[0150] 实施方案O为前述实施方案中任一项的装置,其中用于检测烷基酯酶酶活性成分的酶活性成分指示剂包括3-吡啶基-乙酸酯或其盐。

[0151] 实施方案P为前述权利要求中任一项的装置,其中用于检测磷酸酶酶活性成分的酶活性成分指示剂包括5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸酯或其盐。

[0152] 实施方案Q为前述实施方案中任一项的装置,该装置还包括具有孔隙的水不溶性隔片,该隔片被附接到基底片或覆盖片并且孔隙被定位在基底片与覆盖片之间,其中该孔隙限定样本接收区的外围边界。

[0153] 实施方案R为实施方案Q的装置,其中隔片具有一定厚度;其中该厚度的大小被设计成能够将覆盖片或附着到其的任何层与沉积到样本接收区中的预定体积的含水液体间隔开。

[0154] 实施方案S为前述实施方案中任一项的装置,所述装置还包括设置在基底片与覆盖片之间的在样本接收区中的预定体积的含水液体。

[0155] 实施方案T为前述实施方案中任一项的装置,其中第一水凝胶形成组合物或第二水凝胶形成组合物还包含有效量的至少一种用于生长好氧细菌的营养物质。

[0156] 实施方案U为实施方案T的装置,其中所述至少一种营养物质选自大豆蛋白胨、肉蛋白胨、胰蛋白胨、酵母提取物、丙酮酸或前述营养物质的任两种或更多种的组合。

[0157] 实施方案V为前述实施方案中任一项的装置,所述装置还包含选自下列的营养物质:L-精氨酸、脱脂乳、D-海藻糖以及前述营养物质的任两种或更多种的组合。

[0158] 实施方案W为前述实施方案中任一项的装置,其中第一水凝胶形成组合物或第二水凝胶形成组合物包括基本上干燥的凝聚粉末。

[0159] 实施方案X是一种检测样本中的好氧细菌的方法,该方法包括:

[0160] 使样本材料和含水液体在根据实施方案A至W中任一项所述的装置的样本接收区中接触以形成经接种的培养装置;

[0161] 将经接种的培养装置温育一段时间;以及

[0162] 检测经接种的培养装置中的细菌菌落。

[0163] 实施方案Y为实施方案X的方法,其中检测经接种的培养装置中的细菌菌落包括检测经接种的培养装置中是否存在甲脒染料或所述指示剂中至少一种的可检测报告基团,其中检测是否存在甲脒染料或可检测报告基团可指示细菌菌落是否存在。

[0164] 实施方案Z为实施方案X或实施方案Y的方法,其中使样本材料与装置中的第一水凝胶形成组合物或第二水凝胶形成组合物接触包括将样本放置成与营养物质流体连通以利于好氧细菌的生长。

[0165] 实施方案AA为实施方案X至Z中任一项的方法,其中温育经接种的培养装置包括在约25℃和约44℃之间(包括约25℃和约44℃)的温度下温育经接种的培养装置。

[0166] 实施方案BB为实施方案X至AA中任一项的方法,其中将经接种的培养装置温育一段时间包括将经接种的培养装置温育约22小时至约26小时(包括约22小时和约26小时)。

[0167] 实施方案CC为实施方案X至BB中任一项的方法,该方法还包括在温育经接种的培养装置之后,对存在于经接种的培养装置中的好氧细菌菌落进行计数。

[0168] 以下实施例进一步说明了本发明的优点和实施方案,但是这些实施例中所提及的具体材料及其量以及其他条件和细节均不应被解释为是对本发明的不当限制。除非另外指明或显而易见,否则所有材料均可商购获得,或者是本领域内的技术人员已知的。

[0169] 实施例

[0170] 指示剂

[0171] 以下实施例中使用的指示剂列于表6中。

[0172] 表6

[0173]	指示剂名称	CAS 号	来源
	5-溴-4-氯-3-吡啶基乙酸酯 (X-3-乙酸酯)	3252-36-6	生物合成国际有限公司 (美国伊利诺伊州伊塔斯加) (Biosynth International (Itasca, IL))
	5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-吡喃半乳糖苷(X-Gal)	7240-90-6	生物合成国际有限公司 (Biosynth International)
	5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-吡喃葡萄糖苷(X- β -Glu)	15548-60-4	生物合成国际有限公司 (Biosynth International)
	5-溴-4-氯-3-吡啶基- α -D-吡喃葡萄糖苷(X- α -Glu)	108789-36-2	生物合成国际有限公司 (Biosynth International)
	5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸酯对甲苯胺盐 (BCIP 对-甲苯胺)	6578-06-9	生物合成国际有限公司 (Biosynth International)
	氯化三苯基四唑	298-96-4	西格玛奥德里奇公司 (美国密苏里州圣路易斯) (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO))

[0174] 培养基制剂

[0175] 通过把制剂成分共混到一起,将每种培养基制剂制备为均匀混合物。以下实施例使用的培养基制剂的内容物描述于表7至表8中。

[0176] 表7培养基制剂A(针对实施例1)

[0177]	成分	量 (克)	来源
	肉胨 (猪肉)	3.0	阿尔法生命科学公司 (美国马里兰州巴尔的摩) (Alpha Biosciences (Baltimore, MD))
	大豆蛋白胨	3.0	碧迪公司 (美国新泽西州新富兰克林) (Becton,

[0178]

		Dickinson (New Franklin, NJ))
胰蛋白胨	3.0	碧迪公司 (美国新泽西州新富兰克林) (Becton, Dickinson (New Franklin, NJ))
酵母提取物	6.0	阿尔法生命科学公司 (美国马里兰州巴尔的摩) (Alpha Biosciences (Baltimore, MD))
丙酮酸 (钠盐)	18.5	杰帝贝柯公司 (美国宾夕法尼亚州森特瓦利) (J.T. Baker (Center Valley, PA))
磷酸二氢钾	1.2	EMD Millipore 公司 (美国马萨诸塞州比尔里卡) (EMD Millipore (Billerica, MA))
磷酸氢二钾	3.6	EMD Millipore 公司 (美国马萨诸塞州比尔里卡) (EMD Millipore (Billerica, MA))
右旋糖	1.5	碧迪公司 (美国新泽西州新富兰克林) (Becton, Dickinson (New Franklin, NJ))
硫酸镁	0.1	EMD Millipore 公司 (美国马萨诸塞州比尔里卡) (EMD Millipore (Billerica, MA))
氯化钙	0.1	马林克罗公司 (美国密苏里州圣路易斯) (Mallinckrodt (St. Louis, MO))
氯化镁	0.1	阿法埃莎公司 (美国马萨诸塞州沃德山) (Alfa Aesar (Ward Hill, MA))
碳酸钠	0.1	西格玛奥德里奇公司 (美国密苏里州圣路易斯) (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO))
硫酸锌	0.1	EMD Millipore 公司 (美国马萨诸塞州比尔里卡) (EMD Millipore (Billerica, MA))
L-精氨酸盐酸盐	0.26	EMD Millipore 公司 (美国马萨诸塞州比尔里卡) (EMD Millipore (Billerica, MA))
D-(+)-海藻糖	0.5	阿法埃莎公司 (美国马萨诸塞州沃德山) (Alfa Aesar (Ward Hill, MA))
脱脂乳粉末	0.5	EMD Millipore 公司 (美国马萨诸塞州比尔里卡) (EMD Millipore (Billerica, MA))
成分总计	41.56	

[0179] 表8培养基制剂B (针对实施例2-5)

[0180]

成分	量 (克)	来源
肉脍 (猪肉)	2.2	阿尔法生命科学公司 (美国马里兰州巴尔的摩) (Alpha Biosciences (Baltimore, MD))
大豆蛋白脍	2.2	碧迪公司 (美国新泽西州新富兰克林) (Becton, Dickinson (New Franklin, NJ))
胰蛋白脍	2.2	碧迪公司 (美国新泽西州新富兰克林) (Becton, Dickinson (New Franklin, NJ))
酵母提取物	4.8	阿尔法生命科学公司 (美国马里兰州巴尔的摩) (Alpha Biosciences (Baltimore, MD))
丙酮酸 (钠盐)	14	杰帝贝柯公司 (美国宾夕法尼亚州森特瓦利) (J.T. Baker (Center Valley, PA))
磷酸二氢钾	0.8	EMD Millipore 公司 (美国马萨诸塞州比尔里卡) (EMD Millipore (Billerica, MA))
磷酸氢二钾	2.6	EMD Millipore 公司 (美国马萨诸塞州比尔里卡) (EMD Millipore (Billerica, MA))
右旋糖	1.2	碧迪公司 (美国新泽西州新富兰克林) (Becton, Dickinson (New Franklin, NJ))
硫酸镁水合物	3	EMD Millipore 公司 (美国马萨诸塞州比尔里卡) (EMD Millipore (Billerica, MA))
L-精氨酸盐酸盐	0.07 ^a	EMD Millipore 公司 (美国马萨诸塞州比尔里卡) (EMD Millipore (Billerica, MA))
L-精氨酸盐酸盐	0.21 ^b	
成分总计	33.07 ^a /33.21 ^b	

[0181] a_针对实施例4和5。

[0182] b_针对实施例2和3。

[0183] 接种和温育

[0184] 细菌菌株以KWIK STIK™设备购自微生物制剂 (MicroBiologics) 公司 (美国明尼苏达州圣克劳德 (St. Cloud, MN)), 或者是食物样本或临床样本的天然分离物。根据制造商的说明, 通过分离使细菌从KWIK STIK装置蔓延到胰蛋白酶大豆琼脂培养基上。分离之后, 将各个菌落转移到5ml无菌胰蛋白酶大豆液体培养基上, 在合适的温度下温育24小时。

[0185] 将过夜培养物样本各自在巴特菲尔德氏缓冲水溶液中连续稀释以得到这样的浓度: 其在薄膜培养装置的计数范围内 (大约15-300cfu每装置) 能够计数菌落形成单位数 (cfu)。

[0186] 表9细菌菌株集合A(用于实施例1中)

[0187]	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) (ATCC 51813)
	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) (ATCC 25923)
	铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) (ATCC 35032)
	粪肠球菌 (<i>Enterococcus faecalis</i>) (ATCC 29212)
	斯氏芽孢杆菌 (<i>Bacillus spizizenii</i>) (ATCC 6633)
	酯香微杆菌 (<i>Microbacterium esteraromaticum</i>)
	无乳链球菌 (<i>Streptococcus agalactiae</i>) (ATCC27956)
	普通变形杆菌 (<i>Proteus vulgaris</i>) (ATCC 13315)
	考克氏菌 (<i>Kocuria</i>) 属物种
[0188]	乳脂链球菌 (<i>Streptococcus cremoris</i>) (ATCC19247)
	表10细菌菌株集合B(用于实施例2-5中)

[0189]	荧光假单胞杆菌(<i>Pseudomonas flourescens</i>) (ATCC 17386)
	蜡状芽孢杆菌(<i>Bacillus cereus</i>) (ATCC 10876)
	地衣芽孢杆菌(<i>Bacillus licheniformis</i>) (ATCC 14580)
	斯氏芽孢杆菌(ATCC 6633)
	粪肠球菌(ATCC 29212)
	铜绿假单胞菌(ATCC 27853)
[0190]	恶臭假单胞菌(<i>Pseudomonas putida</i>) (ATCC 49128)
	普通变形杆菌(ATCC 13315)
	酯香微杆菌
	乳酪链球菌(<i>Streptococcus cremoris</i>) (ATCC 19247)
	假单胞菌属
	粪产碱菌(<i>Alcaligenes faecalis</i>) (ATCC 35655)

[0191] 按下列步骤制备标准培养法琼脂(SMA)板:将SMA培养基(23.5g;购自美国新泽西州新富兰克林的碧迪公司(Becton Dickinson;New Franklin,NJ))悬浮在1L纯化水中,并高压消毒。在使用之前,将无菌SMA的温度调节至48+/-2℃。1mL种菌等分试样一式两份各自加入无菌培养皿中,然后加入12-15mL SMA培养基(预先将温度调节至48+/-2℃)。将培养皿轻轻涡旋混合以确保琼脂与接种物混均,然后在32℃下温育48小时。温育期结束时,通过目视检查对每一装置中的菌落进行计数。取各个装置中的cfu计数平均值,确定平均计数值。

[0192] 培养装置

[0193] 采用美国专利No.4,565,783和No.5,089,413中描述的一般流程制备薄膜培养装置。制备各种薄膜培养装置的具体细节在实施例1-5中有所描述。黄原胶和瓜尔胶购自西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich Company)。

[0194] 实施例1制备用于对好氧细菌进行检测和计数的检测装置(具有微孔膜、多种指示剂和胶凝剂共混物)

[0195] 按照美国专利No.4,565,783(该专利全文以引用方式并入本文)的实施例11中所述,制备用于薄膜培养装置的覆盖片的第一涂料制剂(含有TTC和压敏粘合剂(即,美国专利No.5,601,998的实施例1中所述的丙烯酸异辛酯/丙烯酸粘合剂;该专利全文以引用方式并入本文)),然后将其涂覆到双轴取向聚丙烯(BOPP)膜上。接着用瓜尔胶和黄原胶的1:1预共混混合物粉末涂覆BOPP膜的涂覆有粘合剂的一侧。均匀地施涂粉末,并通过用手摇动该膜,将过量的粉末从粘合剂层除去。

[0196] 用于基底片的包含五种生色底物(吡啶基)指示剂的指示剂涂料制剂列于表6中。将这些指示剂溶于合适的极性溶剂中。搅拌所得制剂直到均匀。将溶剂中的指示剂的均匀混合物加入与用来制备(以上)第一涂料制剂相同的压敏粘合剂(即,丙烯酸异辛酯/丙烯酸粘合剂)中,以得到示于表11中的每种指示剂的最终浓度。

[0197] 表11具有生色酶底物的粘合剂组合物。

[0198]	指示剂名称	克指示剂/千克粘合剂
	5-溴-4-氯-3-吡啶基乙酸酯(X-3-乙酸酯)	0.56
	5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-吡喃半乳糖苷(X-Gal)	1.24
	5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷(X-β-Glu)	1.24
	5-溴-4-氯-3-吡啶基-α-D-吡喃葡萄糖苷(X-α-Glu)	1.24
	5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸酯对甲苯胺盐(BCIP p-甲苯胺)	1.24

[0199] 通过合并预共混的培养基制剂A(在表7中描述)、水(1L)和12g黄原胶与瓜尔胶(按重量计1:1)混合物共混物,制备培养基涂料制剂。在搅拌下将所得混合物加热至80℃。然后将该混合物冷却至室温,并储存在冰箱中直至用于涂覆基底片。

[0200] 使用疏水纸材(涂覆有防水聚合物层的漂白的牛皮纸)制备薄膜培养装置的基底片。抵靠涂覆有粘合剂的纸材按压微孔聚丙烯膜片(APTRA经典膜;约38μm厚,约25g/m基重;购自美国马萨诸塞州韦斯特伯勒的RKW Danafilms公司(RKW Danafilms,Westborough,MA)),使其层合。用刀片将混合到压敏粘合剂中的含有表11的吡啶基指示剂的指示剂制剂涂覆(间隙设定为约0.1mm)到附接于基底片的微孔膜上,将经涂覆的层合体在空气中风干。

[0201] 然后,用刀片将冷却的培养基涂料制剂涂覆到干燥指示剂制剂层上(间隙设定为约0.3mm)。将所得经涂覆的层合体在93-104℃的烘箱中干燥1-20分钟。把经涂覆的干燥层合体切成76mm宽×102mm长的部分,其形成本装置的基底片。将带圆形开口(直径为61mm)的泡沫隔片(聚苯乙烯泡沫;76mm宽×102mm长×0.57mm厚)粘合层压到基底片经涂覆的一侧。将圆形开口定位在泡沫层中心附近,从而限定本装置的生长区域。

[0202] 如图4至图6所示,通过使用双面粘合带,将覆盖片(将其切成匹配基底片的尺寸)沿一个边缘附接到基底片上来装配薄膜培养装置。每一装置的覆盖片和基底片被取向成使得被涂覆的表面彼此相向。

[0203] 用选自下列细菌的单一微生物样本接种薄膜培养装置：大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、粪肠球菌、斯氏芽孢杆菌、酯香微杆菌、无乳链球菌、普通变形杆菌、考克氏菌属物种、乳脂链球菌(细菌菌株集合A,表9)。抬起本装置的覆盖片,(通过移液管)向基底片上的培养基中加入1mL种菌。重新放上覆盖片,通过用3M PETRIFILM平板涂布器(美国明尼苏达州圣保罗的3M公司(3M Company, St. Paul, MN))施加向下的压力,将样本均匀分布到圆形开口的边缘。对于每个样本重复制备薄膜培养装置。将经接种的这些装置在32℃下温育24小时,或在35℃下温育24小时。

[0204] 温育期结束时(24小时时间点),通过目视检查对每一装置中的菌落进行计数。计数在圆形开口之内生长的所有菌落的数量,而不论其颜色如何。取各个装置中的cfu计数平均值,确定平均计数值。

[0205] 按照与对于薄膜培养装置所述的相同方式,计数参考SMA板上的菌落数量。温育48小时之后,进行对于SMA板的cfu计数。结果示于表12中。

[0206] 表12

[0207]		平均菌落计数(cfu)		
		实施例 1 32℃下温育 24 小时	实施例 1 35℃下温育 24 小时	参考 SMA 板 32℃下温育 48 小时
	大肠杆菌	383	364	393
	金黄色葡萄球菌	445	540	550
	铜绿假单胞菌	238	167	315
	粪肠球菌	161	144	155
	斯氏芽孢杆菌	13	10	8
	酯香微杆菌	221	194	220
	无乳链球菌	37	32	27
	普通变形杆菌	235	222	225
考克氏菌属物种	158	155	166	
乳酪链球菌	203	194	181	

[0208] 实施例2制备用于对好氧细菌进行检测和计数的检测装置(具有多种指示剂和胶凝剂共混物)

[0209] 按照美国专利No.4,565,783(该专利全文以引用方式并入本文)的实施例11中所述,制备用于薄膜培养装置的覆盖片的第一涂料制剂(含有TTC和压敏粘合剂(即,美国专利No.5,601,998的实施例1中所述的丙烯酸异辛酯/丙烯酸粘合剂;该专利全文以引用方式并入本文)),然后将其涂覆到双轴取向聚丙烯(BOPP)膜上。接着用瓜尔胶和黄原胶的1:1预共混混合物粉末涂覆BOPP膜的涂覆有粘合剂的一侧。均匀地施涂粉末,并通过用手摇动该膜,

将过量的粉末从粘合剂层除去。

[0210] 按照实施例1所述制备含有生色酶底物和压敏粘合剂的指示剂涂料制剂。

[0211] 通过合并预共混的培养基制剂B(描述于表8中)、水(1L)和12g黄原胶与瓜尔胶(按重量计1:1)混合物共混物,制备培养基涂料制剂。在搅拌下将所得混合物加热至80℃。然后将该混合物冷却至室温,并储存在冰箱中直至用于涂覆基底片。然后将该混合物冷却至室温,并储存在冰箱中直至用于涂覆基底片。

[0212] 使用疏水纸材(涂覆有防水聚合物层的漂白牛皮纸)制备薄膜培养装置的基底片。用刀片将混合到压敏粘合剂中的含有表11的吡啶基指示剂的指示剂制剂涂覆(间隙设定为约0.1mm)到基底片上,将经涂覆的基底片在空气中风干。

[0213] 然后,用刀片将冷却的培养基涂料制剂涂覆到干燥指示剂制剂层上(间隙设定为约0.3mm)。将所得经涂覆的层合体在93-104℃的烘箱中干燥1-20分钟。把经涂覆的干燥层合体切成76mm宽×102mm长的部分,其形成本装置的基底片。将带圆形开口(直径为51mm)的泡沫隔片(聚苯乙烯泡沫;76mm宽×102mm长×0.57mm厚)粘合层压到基底片经涂覆的一侧。将圆形开口定位在泡沫层中心附近,从而限定本装置的生长区域。

[0214] 如图1至图2所示,通过使用双面粘合带,将覆盖片(将其切成匹配基底片的尺寸)沿一个边缘附接到基底片上来装配薄膜培养装置。每一装置的覆盖片和基底片被取向成使得被涂覆的表面彼此相向。

[0215] 将选自细菌菌株集合B(表10)的单一微生物样本接种到薄膜培养装置中。抬起本装置的覆盖片,(通过移液管)向基底片上的培养基中加入1mL种菌。重新放上覆盖片,通过用3M PETRIFILM平板涂布器(美国明尼苏达州圣保罗的3M公司(3M Company, St. Paul, MN))施加向下的压力,将样本均匀分布到圆形开口的边缘。将经接种的这些装置在32℃下温育24小时。

[0216] 温育期结束时(24小时时间点),通过目视检查对每一装置中的菌落进行计数。计数在圆形开口之内生长的所有菌落的数量,而不论其颜色如何。

[0217] 将3M PETRIFILM好氧细菌计数板(“PETRIFILM AC板”;美国明尼苏达州圣保罗的3M公司(3M Corporation, St. Paul, MN))用作参照培养装置。按照与对于薄膜培养装置所述相同的方式,接种PETRIFILM AC板,并计数。但PETRIFILM AC板在32℃下温育48小时。结果示于表13中。

[0218] 实施例3制备用于对好氧细菌进行检测和计数的检测装置(具有微孔膜、多种指示剂和胶凝剂共混物)。

[0219] 按照美国专利No. 4,565,783(该专利全文以引用方式并入本文)的实施例11中所述,制备用于薄膜培养装置的覆盖片的第一涂料制剂(含有TTC和压敏粘合剂(即,美国专利No. 5,601,998的实施例1中所述的丙烯酸异辛酯/丙烯酸粘合剂;该专利全文以引用方式并入本文)),然后将其涂覆到双轴取向聚丙烯(BOPP)膜上。接着用瓜尔胶和黄原胶的1:1预共混混合物粉末涂覆BOPP膜的涂覆有粘合剂的一侧。均匀地施涂粉末,并通过用手摇动该膜,将过量的粉末从粘合剂层除去。

[0220] 按照实施例1所述制备含有生色酶底物和压敏粘合剂的指示剂涂料制剂。

[0221] 通过合并预共混的培养基制剂B(描述于表8中)、水(1L)和12g黄原胶与瓜尔胶(按重量计1:1)混合物共混物,制备培养基涂料制剂。在搅拌下将所得混合物加热至80℃。然后

将该混合物冷却至室温,并储存在冰箱中直至用于涂覆基底片。然后将该混合物冷却至室温,并储存在冰箱中直至用于涂覆基底片。

[0222] 使用疏水纸材(涂覆有防水聚合物层的漂白牛皮纸)制备薄膜培养装置的基底片。抵靠涂覆有粘合剂的纸材按压微孔聚丙烯膜片(APTRA经典膜;约38 μ m厚,约25g/m基重;购自美国马萨诸塞州韦斯特伯勒的RKW Danafilms公司(RKW Danafilms,Westborough,MA)),使其层合。用刀片将混合到压敏粘合剂中的含有表11的吡啶基指示剂的指示剂制剂涂覆(间隙设定为约0.1mm)到附接于基底片的微孔膜上,将经涂覆的层合体在空气中风干。

[0223] 然后,用刀片将冷却的培养基涂料制剂涂覆到干燥指示剂制剂层上(间隙设定为约0.3mm)。将所得经涂覆的层合体在93-104℃的烘箱中干燥1-20分钟。把经涂覆的干燥层合体切成76mm宽 $\times$ 102mm长的部分,其形成本装置的基底片。将带圆形开口(直径为51mm)的泡沫隔片(聚苯乙烯泡沫;76mm宽 $\times$ 102mm长 $\times$ 0.57mm厚)粘合层压到基底片经涂覆的一侧。将圆形开口定位在泡沫层中心附近,从而限定本装置的生长区域。

[0224] 如图4至图6所示,通过使用双面粘合带,将覆盖片(将其切成匹配基底片的尺寸)沿一个边缘附接到基底片上来装配薄膜培养装置。每一装置的覆盖片和基底片被取向成使得被涂覆的表面彼此相向。

[0225] 将选自细菌菌株集合B(表10)的单一微生物样本接种到薄膜培养装置中。抬起本装置的覆盖片,(通过移液管)向基底片上的培养基中加入1mL种菌。重新放上覆盖片,通过用3M PETRIFILM平板涂布器(美国明尼苏达州圣保罗的3M公司(3M Company,St.Paul,MN))施加向下的压力,将样本均匀分布到圆形开口的边缘。将经接种的这些装置在32℃下温育24小时。

[0226] 温育期结束时(24小时时间点),通过目视检查对每一装置中的菌落进行计数。计数在圆形开口之内生长的所有菌落的数量,而不论其颜色如何。

[0227] 将PETRIFILM AC板用作参照培养装置。按照与对于薄膜培养装置所述的相同方式,接种PETRIFILM AC板,并计数。但PETRIFILM AC板在32℃下温育48小时。结果示于表13中。

[0228] 实施例4制备用于对好氧细菌进行检测和计数的检测装置(具有多种指示剂)

[0229] 按照美国专利No.4,565,783(该专利全文以引用方式并入本文)的实施例11中所述,制备用于薄膜培养装置的覆盖片的第一涂料制剂(含有TTC和压敏粘合剂(即,美国专利No.5,601,998的实施例1中所述的丙烯酸异辛酯/丙烯酸粘合剂;该专利全文以引用方式并入本文)),然后将其涂覆到双轴取向聚丙烯(BOPP)膜上。接着用瓜尔胶粉末涂覆BOPP膜的涂覆有粘合剂的一侧。均匀地施涂粉末,并通过用手摇动该膜,将过量的粉末从粘合剂层除去。

[0230] 按照实施例1所述制备含有生色酶底物和压敏粘合剂的指示剂涂料制剂。

[0231] 通过合并预共混的培养基制剂B(描述于表8中)、水(1L)和12g瓜尔胶,制备培养基涂料制剂。在搅拌下将所得混合物加热至80℃。然后将该混合物冷却至室温,并储存在冰箱中直至用于涂覆基底片。然后将该混合物冷却至室温,并储存在冰箱中直至用于涂覆基底片。

[0232] 使用疏水纸材(涂覆有防水聚合物层的漂白牛皮纸)制备薄膜培养装置的基底片。用刀片将混合到压敏粘合剂中的含有表11的吡啶基指示剂的指示剂制剂涂覆(间隙设定为

约0.1mm)到基底片上,将经涂覆的基底片在空气中风干。

[0233] 然后,用刀片将冷却的培养基涂料制剂涂覆到干燥指示剂制剂层上(间隙设定为约0.3mm)。将所得经涂覆的层合体在93-104℃的烘箱中干燥1-20分钟。把经涂覆的干燥层合体切成76mm宽×102mm长的部分,其形成本装置的基底片。将带圆形开口(直径为51mm)的泡沫隔片(聚苯乙烯泡沫;76mm宽×102mm长×0.57mm厚)粘合层压到基底片经涂覆的一侧。将圆形开口定位在泡沫层中心附近,从而限定本装置的生长区域。

[0234] 如图1至图2所示,通过使用双面粘合带,将覆盖片(将其切成匹配基底片的尺寸)沿一个边缘附接到基底片上来装配薄膜培养装置。每一装置的覆盖片和基底片被取向成使得被涂覆的表面彼此相向。

[0235] 将选自细菌菌株集合B(表10)的单一微生物样本接种到薄膜培养装置中。抬起本装置的覆盖片,(通过移液管)向基底片上的培养基中加入1mL种菌。重新放上覆盖片,通过使用3M PETRIFILM平板涂布器(美国明尼苏达州圣保罗的3M公司(3M Company, St. Paul, MN))施加向下的压力,将样本均匀分布到圆形开口的边缘。将经接种的这些装置在32℃下温育24小时。

[0236] 温育期结束时(24小时时间点),通过目视检查对每一装置中的菌落进行计数。计数在圆形开口之内生长的所有菌落的数量,而不论其颜色如何。

[0237] 将3M PETRIFILM好氧细菌计数板(“PETRIFILM AC板”;美国明尼苏达州圣保罗的3M公司(3M Corporation, St. Paul, MN))用作参照培养装置。按照与对于薄膜培养装置所述的相同方式,接种PETRIFILM AC板,并计数。但PETRIFILM AC板在32℃下温育48小时。结果示于表13中。

[0238] 实施例5制备用于对好氧细菌进行检测和计数的检测装置(具有微孔膜和多种指示剂)

[0239] 按照美国专利No. 4,565,783(该专利全文以引用方式并入本文)的实施例11中所述,制备用于薄膜培养装置的覆盖片的第一涂料制剂(含有TTC和压敏粘合剂(即,美国专利No. 5,601,998的实施例1中所述的丙烯酸异辛酯/丙烯酸粘合剂;该专利全文以引用方式并入本文)),然后将其涂覆到双轴取向聚丙烯(BOPP)膜上。接着用瓜尔胶粉末涂覆BOPP膜的涂覆有粘合剂的一侧。均匀地施涂粉末,并通过用手摇动该膜,将过量的粉末从粘合剂层除去。

[0240] 按照实施例1所述制备含有生色酶底物和压敏粘合剂的指示剂涂料制剂。

[0241] 通过合并预共混的培养基制剂B(描述于表8中)、水(1L)和12g瓜尔胶,制备培养基涂料制剂。在搅拌下将所得混合物加热至80℃。然后将该混合物冷却至室温,并储存在冰箱中直至用于涂覆基底片。

[0242] 然后将该混合物冷却至室温,并储存在冰箱中直至用于涂覆基底片。

[0243] 使用疏水纸材(涂覆有防水聚合物层的漂白牛皮纸)制备薄膜培养装置的基底片。抵靠涂覆有粘合剂的纸材按压微孔聚丙烯膜片(APTRA经典膜;约38μm厚,约25g/m基重;购自美国马萨诸塞州韦斯特伯勒的RKW Danafilms公司(RKW Danafilms, Westborough, MA)),使其层合。用刀片将混合到压敏粘合剂中的含有表11的吡啶基指示剂的指示剂制剂涂覆(间隙设定为约0.1mm)到附接于基底片的微孔膜上,将经涂覆的层合体在空气中风干。

[0244] 然后,用刀片将冷却的培养基涂料制剂涂覆到干燥指示剂制剂层上(间隙设定为

约0.3mm)。将所得经涂覆的层合体在93-104℃的烘箱中干燥1-20分钟。把经涂覆的干燥层合体切成76mm宽×102mm长的部分,其形成本装置的基底片。将带圆形开口(直径为51mm)的泡沫隔片(聚苯乙烯泡沫;76mm宽×102mm长×0.57mm厚)粘合层压到基底片经涂覆的一侧。将圆形开口定位在泡沫层中心附近,从而限定本装置的生长区域。

[0245] 如图4至图6所示,通过使用双面粘合带,将覆盖片(将其切成匹配基底片的尺寸)沿一个边缘附接到基底片上来装配薄膜培养装置。每一装置的覆盖片和基底片被取向成使得被涂覆的表面彼此相向。

[0246] 将选自细菌菌株集合B(表10)的单一微生物样本接种到薄膜培养装置中。抬起本装置的覆盖片,(通过移液管)向基底片上的培养基中加入1mL种菌。重新放上覆盖片,通过用3M PETRIFILM平板涂布器(美国明尼苏达州圣保罗的3M公司(3M Company, St. Paul, MN))施加向下的压力,将样本均匀分布到圆形开口的边缘。将经接种的这些装置在32℃下温育24小时。

[0247] 温育期结束时(24小时时间点),通过目视检查对每一装置中的菌落进行计数。计数在圆形开口之内生长的所有菌落的数量,而不论其颜色如何。

[0248] 将3M PETRIFILM好氧细菌计数板(“PETRIFILM AC板”;美国明尼苏达州圣保罗的3M公司(3M Corporation, St. Paul, MN))用作参照培养装置。按照与对于薄膜培养装置所述的相同方式,接种PETRIFILM AC板,并计数。但PETRIFILM AC板在32℃下温育48小时。结果示于表13中。

[0249] 表13菌落计数结果。

[0250]

	平均菌落计数(cfu)				
	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5	3M PETRIFILM AC 板(参考)
荧光假单胞杆菌	70	88	78	87	88
蜡状芽孢杆菌	18	24	27	30	13
地衣芽孢杆菌	56	56	42	50	61
斯氏芽孢杆菌	43	42	43	33	34
粪肠球菌	12	20	15	14	11
铜绿假单胞菌	193	245	225	234	282
恶臭假单胞菌	27	42	21	38	38
普通变形杆菌	54	137	64	87	78
酯香微杆菌	18	24	13	19	21
乳酪链球菌	2	18	4	11	0
假单胞菌属	15	49	13	40	45
粪产碱菌	32	74	53	80	92

[0251] 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。而不应被理解为不必要的限制。本发明并不限于所示和所述的具体细节,对本领域的技术人员显而易见的变型亦包括在由权利要求书所限定的本发明中。

[0252] 所有的标题是为了方便阅读,并且不应该用于限定标题下内容的意思,除非特指。

[0253] 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。

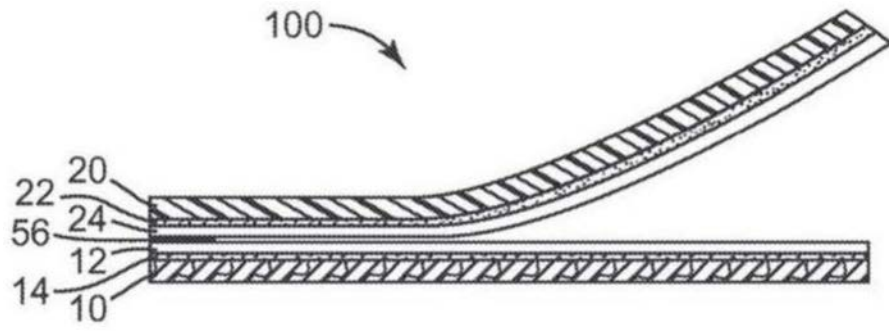


图1

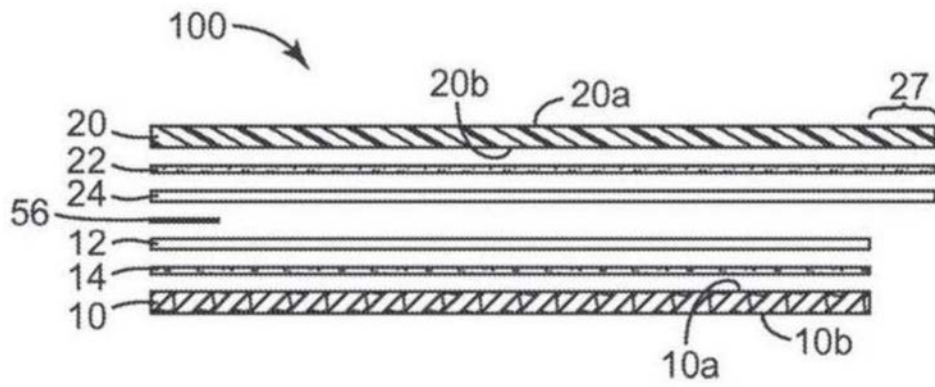


图2

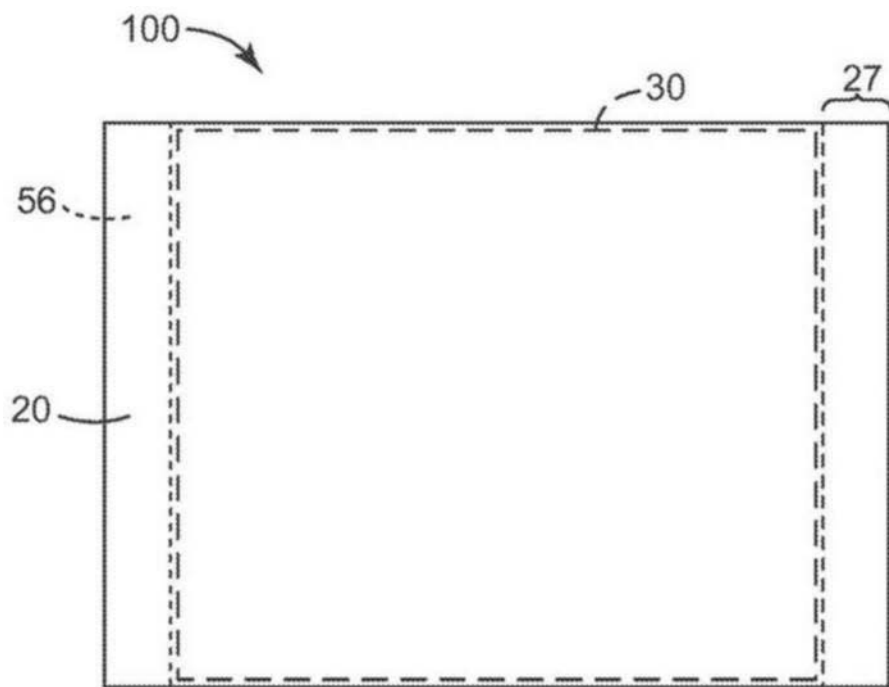


图3

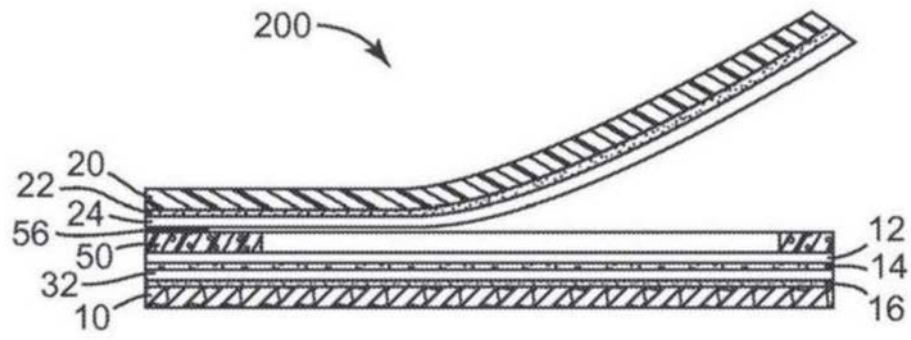


图4

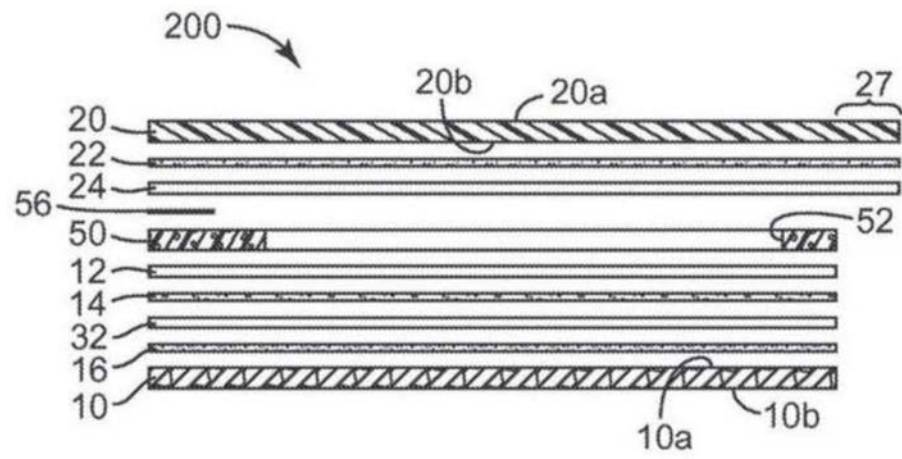


图5

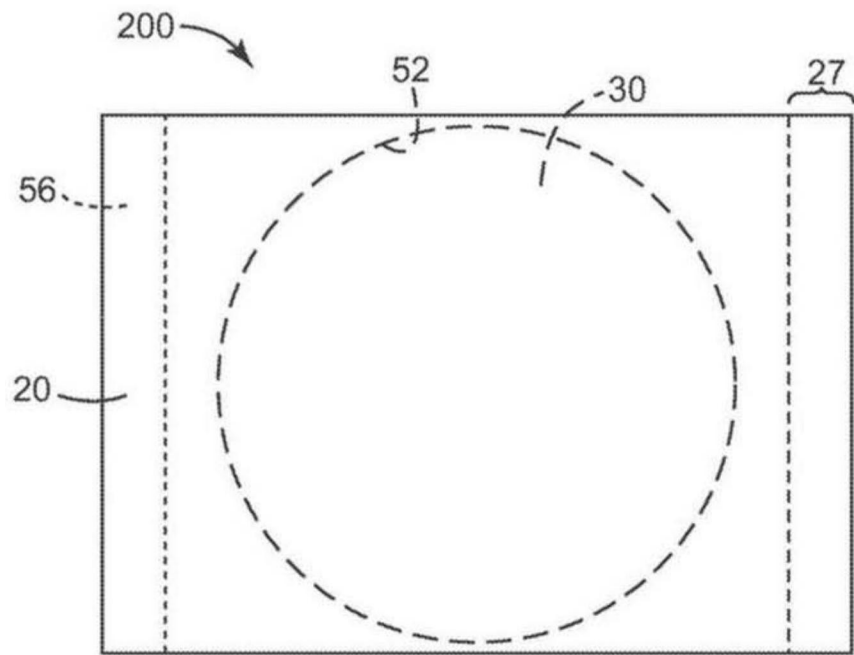


图6