



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102203278 A

(43) 申请公布日 2011. 09. 28

(21) 申请号 200980144680. 1

代理人 徐晶 林森

(22) 申请日 2009. 10. 01

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

12/263829 2008. 11. 03 US

12/472024 2009. 05. 26 US

C12Q 1/04 (2006. 01)

C12Q 1/66 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 05. 03

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/059239 2009. 10. 01

(87) PCT申请的公布数据

W02010/062472 EN 2010. 06. 03

(71) 申请人 通用电气公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 S·M·博耶特 蔡宏 金燕 李洁

杨克超 徐荣 王煜 P·R·赫斯特

江娟

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

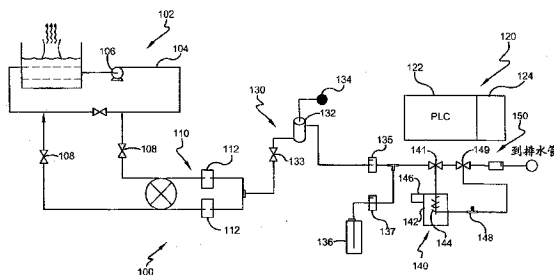
权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图 5 页

## (54) 发明名称

测定水介质中微生物含量的方法和体系

## (57) 摘要

测定水介质中总微生物含量的方法包括向水介质中加入荧光染料,测定水介质中的荧光信号以得到基线荧光信号,通过裂解微生物物质将微生物物质的胞内内容物释放到水介质中,测定含有所释放的微生物物质的胞内内容物的水介质中的荧光信号以得到第二荧光信号,从第二荧光信号中减去基线信号以得到净荧光信号并使净荧光信号等同于微生物含量。还提供了测定总微生物含量的体系和测定生物膜并针对本底噪声调整的方法。



1. 测定水介质中总微生物含量的方法,其包括向水介质中加入荧光染料,测定水介质中的荧光信号以得到基线荧光信号,通过裂解微生物物质将微生物物质的胞内内容物释放到水介质中,测定含有所释放的微生物物质的胞内内容物的水介质中的荧光信号以得到第二荧光信号,从第二荧光信号中减去基线信号以得到净荧光信号并使净荧光信号等同于微生物含量。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述水介质包括水、盐水溶液或磷酸盐缓冲溶液。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述荧光染料为荧光色素。

4. 权利要求 3 的方法,其中所述荧光色素包括吖啶橙、溴化乙锭、Hoechst33258、Hoechst 33342、碘化丙锭、4',6-二脒基-2-苯基吡啶或花青染料。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述荧光染料的存在量为约 0.5mg-约 100mg 荧光染料 / 升水介质。

6. 权利要求 3 的方法,其中所述水介质的 pH 保持为约 2-约 10。

7. 权利要求 6 的方法,其中将缓冲剂加到所述水介质中以保持所述 pH。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述缓冲剂选自磷酸盐缓冲盐水、硼酸盐缓冲剂、三(羟甲基)氨基甲烷、乙二胺四乙酸、N-2-羟基乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸及其混合物。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述荧光信号用荧光光谱仪在约 350nm-约 600nm 的激发波长和约 450nm-约 650nm 的发射波长下测定。

10. 权利要求 1 的方法,其中所述微生物物质用裂解试剂化学裂解以释放胞内物质。

11. 权利要求 10 的方法,其中所述微生物物质用包括洗涤剂、酶、萃取溶剂或裂解缓冲剂的裂解试剂裂解。

12. 权利要求 10 的方法,其中所述裂解试剂以约 1mg-约 10,000mg/升水介质的量加入。

13. 权利要求 1 的方法,其中将所述微生物物质物理、机械或电学裂解以释放胞内物质。

14. 权利要求 13 的方法,其中将所述水介质加热到约 40°C - 约 100°C 的温度历时约 1 分钟 - 约 1 小时以裂解微生物物质的细胞。

15. 权利要求 1 的方法,其中根据校准曲线使所述净荧光信号等同于微生物浓度。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述校准曲线通过测定含有荧光染料的水介质中已知浓度的微生物物质的荧光信号、确定各浓度的净荧光信号、将浓度量与净荧光信号的对数值的关系绘制在图上并进行回归分析以得到校准曲线来制作。

17. 权利要求 26 的方法,其中微生物物质的所述已知浓度通过平板计数方法测定。

18. 权利要求 1 的方法,其还包括根据本底信号调整净荧光信号。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述方法还包括根据本底信号调整净荧光信号,所述方法还包括得到另外的水介质部分作为本底水介质部分,处理本底水介质部分以除去微生物物质,将荧光染料加到经处理的本底水介质部分中,测定经处理的本底水介质部分中的荧光信号以得到本底基线荧光信号,在本底水介质部分中模拟裂解过程,测定经模拟后的本底水介质部分中的荧光信号以得到第二本底荧光信号,从第二本底荧光信号中减去本底基线荧光信号以得到净本底信号,根据净本底信号调整净荧光信号并使经调整的净荧光信号等同于微生物含量。

20. 权利要求 19 的方法,其中将所述本底水介质部分经物理或化学处理。

21. 权利要求 20 的方法,其中所述本底水介质部分通过在约 40°C - 约 100°C 的温度下加热本底水介质约 1 分钟 - 约 1 小时来处理。

22. 权利要求 20 的方法,其还包括将杀生物剂加到本底水介质中。

23. 测定水介质中总微生物含量的方法,其包括向水介质部分中加入荧光染料,得到另外的水介质部分作为本底水介质部分,处理本底水介质部分以除去微生物物质,将荧光染料加到经处理的本底水介质部分中,测定水介质部分中的荧光信号以得到基线荧光信号,测定经处理的本底水介质部分中的荧光信号以得到本底基线荧光信号,通过裂解微生物物质将微生物物质的胞内内容物释放到水介质部分中,在本底水介质部分中模拟裂解过程,测定含有所释放的微生物胞内内容物的水介质中的荧光信号以得到第二荧光信号,测定经模拟后的本底水介质部分中的荧光信号以得到第二本底荧光信号,从第二荧光信号中减去基线信号以得到净荧光信号,从第二本底荧光信号中减去本底基线荧光信号以得到净本底信号,根据净本底信号调整净荧光信号并使经调整的净荧光信号等同于微生物含量。

24. 权利要求 1 的方法,其中所述微生物含量包括生物膜的含量且其中所述方法还包括去除和分散在水介质中的生物膜。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述生物膜通过搅动或涡旋水介质物理去除。

26. 权利要求 24 的方法,其中所述生物膜通过在水介质中使用超声处理探针振动而机械去除。

27. 权利要求 24 的方法,其中所述生物膜是在暴露于电场时从表面去除。

28. 权利要求 24 的方法,其中所述生物膜通过使用表面活性剂、生物分散剂或其混合物化学去除。

29. 权利要求 24 的方法,其还包括计算生物膜所附着的每单位表面积的生生物量。

30. 权利要求 24 的方法,其还包括根据本底荧光信号调整净荧光信号。

31. 测定水介质中生物膜含量的方法,其包括将生物膜分散到水介质中,向水介质中加入荧光染料,测定水介质中的荧光信号以得到基线荧光信号,将微生物物质的胞内内容物释放到水介质中,测定含有所释放的微生物物质的胞内内容物的水介质中的荧光信号以得到第二荧光信号,从第二荧光信号中减去基线荧光信号以得到净荧光信号并使净荧光信号等同于微生物含量。

32. 测定水介质中总微生物含量的体系,其包括:

样品制备组件,其经构造以向水介质中加入荧光染料;

裂解组件,其用于将微生物物质的胞内内容物释放到水介质中;

检测组件,其具有测定绕过裂解组件的水介质样品中的荧光信号以得到基线荧光信号而且还测定通过裂解组件的含有所释放的微生物物质的胞内内容物的水介质样品中的荧光信号以得到第二荧光信号的光学测定单元;和

控制组件,所述控制组件从第二荧光信号中减去基线信号以得到净荧光信号并使所述净荧光信号等同于水介质的微生物含量。

33. 权利要求 32 的体系,其中所述荧光染料为使用试剂加料泵加到水介质中并用混合装置混合的荧光色素。

34. 权利要求 32 的体系,其中所述检测组件包括荧光计,所述荧光计包括构造成围绕

反应管的具有约 350nm- 约 600nm 的激发波长和约 450nm- 约 650nm 的发射波长的至少一对发光二极管 (LED) 和光电二极管发射检测器。

35. 权利要求 32 的体系, 其中所述裂解组件包括使水介质的温度升高的温度控制单元。

36. 权利要求 35 的体系, 其中所述温度控制单元使水介质的温度升高到约 40°C - 约 100°C 的温度以裂解细胞。

37. 权利要求 32 的体系, 其中所述控制组件使用校准曲线使净荧光信号等同于微生物浓度。

38. 测定水介质中总微生物含量的体系, 其包括:

经构造以向水介质中加入荧光染料的样品制备组件;

测定水介质中的荧光信号以得到基线荧光信号的设备;

通过裂解微生物物质将微生物物质的胞内内容物释放到水介质中的设备;

测定含有所释放的微生物物质的胞内内容物的水介质中的荧光信号以得到第二荧光信号的设备; 和

从第二荧光信号中减去基线信号以得到净荧光信号并使所述净荧光信号等同于水介质的微生物含量的控制组件。

39. 权利要求 38 的体系, 其中所述荧光染料为使用试剂加料泵加到水介质中并用混合装置混合的荧光色素。

40. 权利要求 38 的体系, 其中测定荧光信号的设备包括荧光计, 所述荧光计包括构造成围绕反应管的具有约 350nm- 约 600nm 的激发波长和约 450nm- 约 650nm 的发射波长的至少一对发光二极管 (LED) 和光电二极管发射检测器。

41. 权利要求 38 的体系, 其中裂解微生物物质的设备包括使水介质的温度升高的温度控制单元。

42. 权利要求 41 的体系, 其中所述温度控制单元使水介质的温度升高到约 40°C - 约 100°C 的温度以裂解细胞。

43. 权利要求 38 的体系, 其中所述控制组件使用校准曲线使净荧光信号等同于微生物浓度。

44. 测定水介质中总微生物含量的体系, 其包括:

样品制备组件, 其经构造以向水介质中加入荧光染料;

裂解组件温度控制单元, 其通过将水介质加热到约 40°C - 约 100°C 的温度使微生物物质的细胞裂解以将微生物物质的胞内内容物释放到水介质中;

检测组件, 所述检测组件具有测定水介质中的荧光信号以得到基线荧光信号而且测定含有所释放的微生物物质的胞内内容物的水介质中的荧光信号以得到第二荧光信号的荧光计, 其中所述荧光计包括构造成围绕反应管的具有约 350nm- 约 600nm 的激发波长和约 450nm- 约 650nm 的发射波长的至少一对发光二极管 (LED) 和光电二极管发射检测器; 和

控制组件, 所述控制组件从第二荧光信号中减去基线信号以得到净荧光信号并使所述净荧光信号等同于水介质的微生物含量。

## 测定水介质中微生物含量的方法和体系

### 发明领域

[0001] 本发明涉及用于量化水介质中微生物含量的方法和体系,且更详细地讲,涉及用于测定总微生物含量的基于荧光的测定。

### [0002] 发明背景

[0003] 公用水体系中微生物活性的存在会引起健康风险。此外,工业体系中微生物的检测和控制对于各种行业都是关键的,因为这类有机体的存在显著促成体系腐蚀、沉积和结垢并直接影响体系的操作成本。监测工业体系和公用水体系中的微生物浓度以及诸如通过施用杀生物剂来处理这些体系是维护这些体系的重要部分。

[0004] 用于微生物检测的常规监测体系使用基于培养的方法或基于生物化学发光的方法。这两种方法均量化了微生物群;然而,这两种方法都存在与这些方法相关联的固有缺点和缺陷。基于培养的方法需要漫长的培育时间且常常由于培养基的组成而低估微生物数量。生物化学发光方法是快速的,但不精确且常得到假阳性和假阴性结果。

[0005] 生物膜对于监测微生物浓度提供了额外关注。生物膜为以复杂聚集物形式生长并附着到惰性或活性表面的微生物群。生物膜中的细胞通过诸如外切多糖、脂多糖或糖蛋白的聚合物基质而彼此紧密结合。除了上述结垢、腐蚀问题和健康关注之外,生物膜可降低工业冷却水体系中的传热和液压,堵塞注水射流并阻塞滤水器,且引起微生物影响的腐蚀。生物膜受到外切聚合物层保护且对消毒剂及其他杀生物剂具有极高抵抗性。

[0006] 需要用于量化水介质中微生物含量(包括量化生物膜含量)的具有高灵敏度的准确且迅速的体系和方法。

### [0007] 发明概述

[0008] 在一个实施方案中,测定水介质中总微生物含量的方法包括向水介质中加入荧光染料,测定水介质中的荧光信号以得到基线荧光信号,通过裂解微生物物质将微生物物质的胞内内容物释放到水介质中,测定含有所释放的微生物物质的胞内内容物的水介质中的荧光信号以得到第二荧光信号,从第二荧光信号中减去基线信号以得到净荧光信号并使净荧光信号等同于微生物含量。

[0009] 在另一实施方案中,已经发现测定水介质中总微生物含量的体系,其通过向水介质中加入荧光染料,测定水介质中的荧光信号以得到基线荧光信号,随后通过裂解微生物物质将微生物物质的胞内内容物释放到水介质中进行。所述体系随后测定含有所释放的微生物物质的胞内内容物的水介质中的荧光信号以得到第二荧光信号。接着,所述体系从第二荧光信号中减去基线信号以得到净荧光信号并使净荧光信号等同于微生物含量。

[0010] 在另一实施方案中,总微生物含量体系包括经构造以向水介质中加入荧光染料的样品制备组件和将微生物物质的胞内内容物释放到水介质中的裂解组件。所述体系还包括检测组件,所述检测组件具有测定水介质中的荧光信号以得到基线荧光信号且随后测定含有所释放的微生物物质的胞内内容物的水介质中的荧光信号以得到第二荧光信号的光学测定单元。所述体系还含有控制组件,所述控制组件从第二荧光信号中减去基线信号以得到净荧光信号并使净荧光信号等同于水介质的微生物含量。

[0011] 各种实施方案提供了用于测定水介质中总微生物含量的改进的方法和体系,其易用、价廉、准确且灵敏度高且可以在短时间内完成。

[0012] 附图简述

[0013] 图 1 描绘对于在热压处理的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中稀释的荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 来讲 LOG  $\Delta$  RLU 相对于 LOG 细胞浓度 (cfu/ml) 的回归曲线图。

[0014] 图 2 描绘对于在过滤的冷却塔水中稀释的荧光假单胞菌来讲 LOG  $\Delta$  RLU 相对于细胞浓度 (cfu/ml) 的回归曲线图。

[0015] 图 3 描绘对于在热压处理的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中稀释的荧光假单胞菌来讲基于总微生物含量的细胞浓度 (cfu/ml) 和平板计数及 ATP 生物发光相对于细胞稀释度的测定读数的曲线。

[0016] 图 4 描绘对于在过滤的冷却塔水中稀释的荧光假单胞菌来讲基于总细菌测定的细胞浓度 (cfu/ml) 和平板计数及 ATP 生物发光相对于细胞稀释度的测定读数的曲线。

[0017] 图 5 描绘对于在热压处理的冷却塔水中稀释的荧光假单胞菌来讲 LOG  $\Delta$  RLU 相对于 LOG 细胞浓度 (cfu/ml) 的回归曲线图。

[0018] 图 6 描绘对于悬浮在 0.85 % 盐水缓冲液中的绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 生物膜来讲 LOG  $\Delta$  RLU 相对于 LOG 细胞浓度 (cfu/ml) 的回归曲线图。

[0019] 图 7 为根据本发明的一个实施方案用于监测水介质中的总细菌含量的体系的示意图。

[0020] 图 8 为图 7 的总细菌监测体系的光学测定单元。

[0021] 发明详述

[0022] 除非上下文明确规定相反,否则单数形式“一个/种”和“所述”包括复数个讨论对象。描述相同特征的所有范围的端点可以独立组合并将所述端点包括在内。所有参考文献都通过引用结合到本文中。

[0023] 结合量使用的修饰语“约”将所说明的值包括在内且具有由上下文规定的含义(例如,包括与特定量的测定相关的公差范围)。

[0024] “任选的”或“任选地”是指随后描述的事件或情况可能出现或可能不出现,或者随后确定的物质可能不存在或者可能存在,并且该描述包括其中发生该事件或情况或其中存在该物质的情形和其中不发生该时间或情况或其中不存在该物质的情形。

[0025] 在一个实施方案中,测定水介质中总微生物含量的方法包括向水介质中加入荧光染料,测定水介质中的荧光信号以得到基线荧光信号,通过裂解微生物物质将微生物物质的胞内内容物释放到水介质中,测定含有所释放的微生物物质的胞内内容物的水介质中的荧光信号以得到第二荧光信号,从第二荧光信号中减去基线信号以得到净荧光信号并使净荧光信号等同于微生物含量。

[0026] 所述方法测定水介质中的总微生物含量。所述微生物物质可为微生物,诸如细菌。细菌的非限定性实例包括绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭极毛杆菌 (*Pseudomonas putida*)、去磺弧菌 (*Desulfovibrio desulfuricans*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、土生丛毛单胞菌 (*Comamonas terrigena*)、欧洲亚硝化单胞菌 (*Nitrosomonas europaea*)、普通硝化杆菌 (*Nitrobacter vulgaris*)、浮游球衣细菌 (*Sphaerotilus natans*)、盖氏铁柄杆菌

种 (*Gallionella* species)、土壤分枝杆菌 (*Mycobacterium terrae*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、短黄杆菌 (*Flavobacterium breve*)、沙门氏杆菌 (*Salmonella enterica*)、伤寒沙门氏菌 (*Enterica* serovar *Typhimurium*)、萎缩芽孢杆菌 (*Bacillus atrophaeus* spore)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、放线共生放线杆菌 (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)、白念珠菌 (*Candida albicans*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

[0027] 水介质可为可含有微生物物质的任何类型的水介质,包括生物膜微生物已经去除或分散到其中的水介质。在一个实施方案中,所述水介质为水。在一个实施方案中,所述水可为城市用水或工业用水,诸如冷却塔水。在另一实施方案中,所述水介质可为用于个人护理产品制造或食品和饮料或医药加工的水溶液。在一个实施方案中,所述水介质可为盐水溶液。在另一实施方案中,所述水介质可为磷酸盐缓冲溶液。

[0028] 将荧光染料加到水介质中。所述荧光染料可为在微生物物质存在下改变其荧光信号的任何类型的染料。在一个实施方案中,所述荧光染料为荧光色素,其为与诸如核酸、蛋白质、胞质组分和膜组分的生物细胞组分结合的微生物染色染料。

[0029] 荧光色素的实例包括但不限于吖啶橙、溴化乙锭 (ethidium bromide)、Hoechst33258、Hoechst 33342、碘化丙锭 (propidium iodide)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚和市售的核酸染料,诸如 PicoGreen<sup>®</sup>、SYTO<sup>®</sup> 16、SYBR<sup>®</sup> Green I、SYBR<sup>®</sup> Green II、SYBR<sup>®</sup> Gold、YOYO<sup>™</sup>、TOTO<sup>™</sup>、TO-PRO<sup>®</sup>、YO-PRO<sup>®</sup>、Texas Red<sup>®</sup>、RedmondRed<sup>®</sup>、Bodipy<sup>®</sup> Dyes 或 Oregon Green<sup>®</sup>。荧光色素可从 Molecular Probes (Eugene, OR)、Sigma Chemical (St Louis, Mo.)、Amersham (Arlington Heights, IL.)、Calbiochem-Novabiochem (La Jolla, CA) 或 Synthetic Genetics (San Diego, CA) 购得。在另一实施方案中,所述荧光色素染料可为花青染料,其可作为 PicoGreen<sup>®</sup>、TOTO<sup>™</sup>、SYBR<sup>®</sup> Green I、SYBR<sup>®</sup> Green II、SYBR<sup>®</sup> Gold 或 SYBR<sup>®</sup> Green I 购得。在另一实施方案中,荧光色素染料为不对称的花青染料,诸如 SYBR<sup>®</sup> Green I。

[0030] 所述荧光染料以适于使水介质中的微生物物质发荧光的量加到水介质中。在一个实施方案中,所述荧光染料以约 0.5mg- 约 100mg 荧光染料 /L 水介质的量加入。在另一实施方案中,所述荧光染料以约 0.5mg- 约 10mg 荧光染料 /L 水介质的量加入。在另一实施方案中,所述染料以约 0.5mg- 约 1.0mg 荧光染料 /L 水介质的量加入。

[0031] 在一个实施方案中,移出一部分水介质用于测试。水介质部分可手动移出或者可通过在线测试装置系统地移出。将荧光染料加到水介质中并通过混合分散。在另一实施方案中,将荧光染料的溶液注入水介质样品中并共混。

[0032] 当使用荧光色素时,将水介质的 pH 保持在合适范围内以便优化染料的荧光。在一个实施方案中,水介质的 pH 保持为约 4.0- 约 9.5。在另一实施方案中,水介质的 pH 保持为约 7.0- 约 8.0。

[0033] 在一个实施方案中,将缓冲剂加入水介质中以将水介质的 pH 保持在合适范围内。所述缓冲剂可为不影响水介质中的微生物物质或荧光测定的任何类型的缓冲剂。在一个实施方案中,所述缓冲剂为无机缓冲剂,诸如磷酸盐缓冲盐水或硼酸盐缓冲液。在另一实施方案中,所述缓冲剂为有机缓冲剂,诸如三(羟甲基)氨基甲烷、乙二胺四乙酸、N-2-羟基乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸或其混合物。在一个实施方案中,所述缓冲剂为三(羟甲基)氨基

甲烷和乙二胺四乙酸的共混物。在另一实施方案中,浓度范围为约 1mol/L- 约 30mmol/L 的三(羟甲基)氨基甲烷和浓度范围为约 100mmol/L- 约 3mmol/L 的乙二胺四乙酸的共混物的摩尔比为约 10 : 1。

[0034] 可以在将荧光色素加到水介质中之前或之后加入缓冲剂。在一个实施方案中,将荧光色素和缓冲剂预混合且一起加入水介质中。

[0035] 在一个实施方案中,将缓冲剂以基于水介质的体积计算约 1% 体积 - 约 30% 体积的量加到水介质中。在另一实施方案中,将缓冲剂以基于水介质的体积计算约 1% 体积 - 约 15% 体积的量加到水介质中。在另一实施方案中,将缓冲剂以基于水介质的体积计算约 5% 体积 - 约 10% 体积的量加到水介质中。

[0036] 基线荧光信号通过测定含有荧光染料的水介质的荧光来得到。如本文所用,“荧光”是指当化合物受到较短波长的光激发时发射的光。激发和发射波长取决于所选择的荧光染料。在一个实施方案中,激发波长为约 350nm- 约 600nm,发射波长为约 450nm- 约 650nm。

[0037] 荧光可通过任何类型的荧光检测器测定。在一个实施方案中,荧光信号通过荧光光谱学、荧光显微术、荧光二极管阵列检测、微板荧光读数或流式细胞术测定。在一个实施方案中,荧光检测器为便携式基于荧光的检测装置或具有荧光分光镜的在线水状态监测仪器。在一个实施方案中,便携式基于荧光的检测装置具有 LED 激发光和 PMT 发射检测器。在一个实施方案中,便携式基于荧光的检测装置具有 LED 激发光和光电二极管发射检测器。

[0038] 测定快速进行且可采取数次测定并取平均值。微生物物质可以低至 10<sup>4</sup> 菌落形成单位 (cfu)/ml 所测试水介质的浓度检测,而不需要测试前的浓缩过程。

[0039] 基线测定可手动记录或在在线监视仪器中测定并储存。

[0040] 荧光染料使微生物细胞组分染色,但是其不能透过微生物细胞的完整细胞膜。为了测定总微生物含量,将微生物物质的胞内内容物释放到水介质中,在此其可被荧光染料接触。在一个实施方案中,微生物物质的胞内内容物通过裂解微生物物质的细胞来释放,溶胞使细胞膜分裂开。裂解可使用机械、化学、物理、电学、超声或微波方法或这些方法的任何组合进行。

[0041] 机械裂解诸如通过剪切、振动或力物理上破坏细胞障壁。机械方法的实例包括但不限于压力驱使细胞流经在流体通道中的过滤器样结构或小型条,用低离子强度水的迅速扩散混合渗透性地压迫细胞,使细胞经受剪切力同时进入具有尖锐小型结构的特定区域,用微珠搅拌器或珠磨破坏细胞障壁或对水介质中的细胞施加超声波能量。

[0042] 当使用化学品破坏细胞障壁时发生化学裂解并允许胞内内容物释放。可使用可以破坏细胞障壁的任何化学品。在一个实施方案中,使用洗涤剂、酶、萃取溶剂或裂解缓冲剂。洗涤剂包括但不限于十二烷基硫酸盐、3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲铵基(ammonio)]-1-丙烷磺酸盐、TWEEN™ 20 洗涤剂、TRITON™ X 系列洗涤剂、胆酸钠、脱氧胆酸钠、氯化钆。酶包括但不限于溶菌酶、变溶菌素、labiase、溶葡萄球菌素、溶细胞酶、蛋白酶 K、内溶菌素或消色肽酶(achromopeptidase)。萃取溶剂包括但不限于聚乙烯基聚吡咯烷酮、苯酚、三氯三氟乙烷或苯酚和硫氰酸钆或氯化钆的混合物。裂解缓冲剂包括但不限于氯化铵、季铵化合物、十六烷基三甲基溴化铵、鲸蜡基三甲基溴化铵、十二烷基硫酸钠、六偏磷酸钠、焦磷酸钠、Zap-o-globin™、可从 Coulter Diagnostics 购得的裂解缓冲剂或可从 Molecular Probes



购得的 CyQUANT™ 裂解缓冲剂。

[0043] 所述试剂可以适合裂解微生物物质的任何量加入且可以过量加入。在一个实施方案中,所述试剂以约 1mg- 约 10,000mg/L 水介质的量加入。在另一实施方案中,所述试剂以约 1mg- 约 1000mg/L 水介质的量加入。在另一实施方案中,所述试剂以约 1mg- 约 50mg/L 水介质的量加入。

[0044] 物理裂解可通过热方式或通过冻融发生。裂解可通过诸如用热块或加热板加热水介质来通过热方式实现。在一个实施方案中,将水介质加热到约 40℃ - 约 100℃ 的温度。在另一实施方案中,所述温度为约 40℃ - 约 60℃。在一个实施方案中,将水介质加热约 1 分钟 - 约 1 小时。在另一实施方案中,将水介质加热约 1 分钟 - 约 30 分钟,包括约 1 分钟 - 约 15 分钟。在另一实施方案中,将水介质加热约 1 分钟 - 约 3 分钟。

[0045] 在冻融的一个实例中,将水介质诸如在乙醇 - 干冰浴中冷冻且随后使其熔融。

[0046] 细胞可用一系列电脉冲、通过扩散混合或介电电泳截留或由微波辐射通过电方式裂解。也可将自由基用于裂解。所述方法包括对水介质中的金属离子、过氧化物和微生物物质的混合物施加电场以产生攻击细胞障壁的自由基。

[0047] 在已经提取微生物物质的胞内内容物并将其释放到水介质中之前和之后测定水介质的荧光信号以分别提供基线荧光信号和第二荧光信号。这些荧光信号可手动记录或者可在在线监视仪器中测定并储存。

[0048] 从第二荧光信号中减去基线荧光信号以得到净荧光信号。

[0049] 可使净荧光信号等同于总微生物含量。可对于所选择的荧光染料根据微生物物质的已知浓度和所述浓度的荧光测定制作校准曲线。在一个实施方案中,微生物物质的浓度通过平板计数方法测定。在一个实施方案中,测定含有已知总微生物含量和所选择的荧光染料的数个样品以得到荧光信号。将这些信号的对数值绘制在图上,且可进行回归分析以得到使总微生物含量等同于荧光信号的校准曲线。

[0050] 总细菌浓度可快速且根据选择用于释放生物物质的胞外含量的方法来测定,测定可在 5 分钟内完成。快速测定非常适合实验室使用、现场应用、在线自动分批体系或脱机监测体系。在另一实施方案中,测定可自动且连续进行。

[0051] 在另一实施方案中,可得到本底荧光信号以除去本底干扰并改进水介质中微生物含量的测定准确度。本底信号可通过测定任何另外的有机或非细胞组分的荧光来得到。在一个实施方案中,将本底信号从净荧光信号中减去。在一个实施方案中,测定水介质中总微生物含量的方法包括向水介质部分中加入荧光染料,得到另外的水介质部分作为本底水介质部分,处理本底水介质部分以除去微生物物质,将荧光染料加到经处理的本底水介质部分中,测定水介质部分中的荧光信号以得到基线荧光信号,测定经处理的本底水介质部分中的荧光信号以得到本底基线荧光信号,通过裂解微生物物质将水介质部分中的微生物物质的胞内内容物释放到水介质中,模拟本底水介质部分中的裂解过程,测定含有所释放的微生物胞内内容物的水介质部分中的荧光信号以得到第二荧光信号,测定经模拟后的本底水介质部分中的荧光信号以得到第二本底荧光信号,从第二荧光信号中减去基线信号以得到净荧光信号,从第二本底荧光信号中减去本底基线荧光信号以得到净本底信号,根据净本底信号调整净荧光信号并使经调整的净荧光信号等同于微生物含量。

[0052] 水介质如上所述。对于任何类型的水介质可得到本底信号,但是对于具有大量在

荧光染料存在下发荧光的有机或非细胞组分的水介质（诸如来自原油处理的工艺水）最有帮助。在一个实施方案中，水介质部分和本底水介质部分具有相同的体积。

[0053] 加入荧光染料和得到基线荧光信号的步骤、释放微生物物质的胞内内容物、得到第二荧光信号和得到净荧光信号如上所述。

[0054] 可对水介质进行处理以除去微生物物质。可通过加热水介质或通过用诸如漂白剂、氯气、其他商业杀生物剂或其组合的杀生物剂处理水介质而从水介质中除去微生物物质以便得到本底信号。在一个实施方案中，氯气的使用量为约 0.1ppm- 约 30ppm。在另一实施方案中，氯气的使用量为约 0.1ppm- 约 20ppm，包括约 0.1ppm- 约 10ppm。杀生物剂的使用量可为约 1ppm- 约 200ppm。在另一实施方案中，杀生物剂的使用量为约 1ppm- 约 100ppm，包括约 1ppm- 约 50ppm。当使用氯气时，可能必需在使本底微生物效应减至最小后中和氯气。在一个实施方案中，使用焦亚硫酸钠来中和氯气。在一个实施方案中，将焦亚硫酸钠以约 1ppm- 约 500ppm 的量加到水介质中。在另一实施方案中，将焦亚硫酸钠以约 1ppm- 约 300ppm、包括约 1ppm- 约 200ppm 的量加到水介质中。

[0055] 在另一实施方案中，微生物物质组分可通过诸如用热块或加热板加热水介质来除去。在一个实施方案中，将水介质加热到约 40°C - 约 100°C 的温度。在另一实施方案中，所述温度为约 40°C - 约 70°C。在另一实施方案中，所述温度为约 40°C - 约 60°C。在一个实施方案中，将水介质加热约 1 分钟 - 约 1 小时。在另一实施方案中，将水介质加热约 1 分钟 - 约 30 分钟，包括约 1 分钟 - 约 15 分钟。在另一实施方案中，将水介质加热约 1 分钟 - 约 3 分钟。

[0056] 本底基线荧光信号可通过测定经处理以除去微生物物质的水介质部分的荧光来得到。激发和发射波长取决于所选择的荧光染料。在一个实施方案中，激发波长为约 350nm- 约 600nm，发射波长为约 450nm- 约 650nm。荧光可通过如上所述的荧光检测器测定。本底基线信号可手动记录或在在线监视仪器中测定并储存。

[0057] 裂解过程可在经处理的本底水介质部分中模拟。在一个实施方案中，使将胞内微生物内容物释放到水介质部分中的过程在已经除去微生物物质的本底水介质部分中重复。如上所述，裂解可使用机械、化学、物理、电学、超声或微波方法或这些方法的任何组合进行。

[0058] 第二本底荧光信号可通过测定模拟后的本底水介质的荧光来得到。激发和发射波长取决于所选择的荧光染料。在一个实施方案中，激发波长为约 350nm- 约 600nm，发射波长为约 450nm- 约 650nm。荧光可通过如上所述的荧光检测器测定。第二本底荧光信号可手动记录或在在线监视仪器中测定并储存。

[0059] 可将本底基线荧光信号从第二本底荧光信号中减去以得到净本底信号。净荧光信号可通过从净荧光信号中减去净本底信号来调整以得到经调整的净荧光信号。

[0060] 可使经调整的净荧光信号等同于总微生物含量。可对于所选择的荧光染料根据微生物物质的已知浓度和荧光测定制作校准曲线。在一个实施方案中，测定含有已知总微生物含量和所选择的荧光染料的数个样品以得到荧光信号。将这些信号的对数值绘制在图上，且进行回归分析以得到使总微生物含量等同于荧光信号的校准曲线。

[0061] 水介质部分可手动移出或者可通过在线测试装置系统地移出。

[0062] 在另一实施方案中，生物膜的浓度可被量化。生物膜附于包括但不限于玻璃、塑

料、金属或涂料的表面且可将其从表面去除并分散在水介质中以测定生物膜的总微生物含量。在一个实施方案中,测定水介质中生物膜含量的方法包括将生物膜分散到水介质中,向水介质中加入荧光染料,测定水介质中的荧光信号以得到基线荧光信号,通过裂解微生物物质将微生物物质的胞内内容物释放到水介质中,测定含有所释放的微生物物质的胞内内容物的水介质中的荧光信号以得到第二荧光信号,从第二荧光信号中减去基线荧光信号以得到净荧光信号并使净荧光信号等同于微生物含量。

[0063] 必须将生物膜或固着微生物从表面处分开并将其分散在水介质中以量化生物膜的微生物浓度。水介质可为已经去除或分散有生物膜微生物于其中的任何类型的水介质。在一个实施方案中,生物膜分散在盐水溶液。在另一实施方案中,生物膜分散在缓冲盐水溶液。在另一实施方案中,所述水介质可为磷酸盐缓冲溶液。在另一实施方案中,所述水介质为水。在另一实施方案中,所述水可为城市用水或工业用水,诸如冷却塔水。

[0064] 可通过不破坏单个细胞结构并可通过物理方法、机械方法、化学方法或这些方法的组合实现的任何合适方式将微生物细胞从生长表面剥离或去除并将其分散在水介质中。分开和分散生物膜细胞的物理方法的实例包括但不限于用强剪切应力搅动、涡流、振荡和洗涤。在一个实施方案中,生物膜用涡流分散。在一个实施方案中,将生物膜试样浸在液体中且通过产生围绕其快速涡流或旋流(如在旋风分离器中)的流体流历时合适时间以从聚集体释放细胞而从试样去除细胞。在一个实施方案中,将生物膜涡流约 5 秒-约 5 分钟。在另一实施方案中,将生物膜涡流约 10 秒-约 3 分钟。在另一实施方案中,将生物膜涡流约 15 秒-约 1 分钟。在另一实施方案中,将生物膜涡流约 30 秒。

[0065] 用于分开并分散生物膜细胞的机械方法的实例包括但不限于使用超声处理浴或电流。

[0066] 用于分开并分散生物膜细胞的化学方法的实例包括但不限于加入表面活性剂、分散剂或消化酶。表面活性剂的实例包括但不限于环氧乙烷和 / 或环氧丙烷 (EO/PO) 共聚物、二甲基酰胺聚合物、Ultra-Kleen™ 杀生物剂(从 Sterilex (Owings Mills, MD) 购得)、辛磺酸钠或烷基多糖苷。酶的实例包括但不限于纤维素酶、 $\alpha$ -淀粉酶和蛋白酶的共混物。在一个实施方案中,所述分散剂可为聚乙烯亚胺。

[0067] 在已将生物膜去除并分散在水介质中之后,进行总微生物测定。向水介质中加入荧光染料、测定水介质中的荧光信号以得到基线荧光信号、将微生物物质的胞内内容物释放到水介质中、测定含有所释放的微生物物质的胞内内容物的水介质中的荧光信号以得到第二荧光信号、得到净荧光信号和使净荧光信号等同于微生物含量的步骤如上所述。

[0068] 在另一实施方案中,微生物总量 (cfu) 可通过浓度乘以去除的生物膜已进入其中的水介质的已知体积来得到。在另一实施方案中,每单位表面积微生物的量 (cfu/cm<sup>2</sup>) 可通过将微生物的量除以生物膜所附着表面的单位面积得到。

[0069] 生物膜可通过从已知尺寸的所选择体系表面取生物膜样品来直接测定。或者,可将试样用于生长并测定体系使生物膜生长的倾向。水体系的一些区域难以接近来实际取样,试样测试提供体系生长生物膜的倾向的测定。该方法也可以提供处理程序已成功地降低了经处理的体系生长生物膜的倾向的证据。

[0070] 在另一实施方案中,可得到本底荧光信号以去除本底干扰并改进水介质中生物膜含量的测定准确度。

[0071] 为了使本领域技术人员能够很好地实践本发明,以说明而不是限制的方式提供了以下实施例。

## 实施例

[0072] 实施例 1

[0073] 在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的校准曲线:

[0074] 使荧光假单胞菌细胞在液体培养基中生长过夜并将其加到 10ml PBS 中以形成初始样品。从初始样品进行连续稀释。将 0.1ml 初始样品加到 9.9ml PBS 中以制得 1% ( $10^{-2}$ ) 溶液。将 1ml 的 1% 溶液加到 9ml PBS 中以制得 0.1% ( $10^{-3}$ ) 溶液。将 1ml 的 0.1% 溶液加到 9ml PBS 中以制得 0.01% ( $10^{-4}$ ) 溶液。将 1ml 的 0.01% 溶液加到 9ml PBS 中以制得 0.001% ( $10^{-5}$ ) 溶液。将 10ml PBS 用作无细胞的空白样。

[0075] 从各稀释的样品和无细胞的空白样中取 170  $\mu$ l 样品并将各样品与 20  $\mu$ l 10XSYBR®Green I 染料和 10  $\mu$ l 20X CyQUANT™ 裂解缓冲液 (可从 Molecular Probes 购得) 混合。通过 LS55 发光光谱仪 (PerkinElmer) 在 497nm 的激发波长和 520nm 的发射波长下测定各样品 (无细胞的空白样、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$ ) 的荧光强度。对于各样品测定荧光四次并取平均值以得到荧光强度 I 信号。

[0076] 将样品在 60°C 下加热 2 分钟,随后冷却到室温。在 497nm 的激发波长和 520nm 的发射波长下测定各稀释的样品 ( $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$ ) 的荧光强度。对于各样品测定荧光四次并取平均值以得到荧光强度 II 信号。

[0077]  $\Delta$  荧光强度 ( $\Delta$ ) 通过从荧光强度 II 信号中减去荧光强度 I 信号得到。

[0078] 使用标准平板计数法得到各样品 (无细胞的空白样、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$ ) 的总荧光假单胞菌的浓度。

[0079] 在  $\Delta$  荧光强度 (相对荧光单位 (RLU)) 的对数值和平板计数 (cfu/ml) 的对数值之间进行回归分析以得到如图 1 所示的校准曲线。回归方程为  $y = -1.37 + 0.855x$  ( $R-Sq = 97.6\%$ )。

[0080] 实施例 2

[0081] 校准曲线:

[0082] 如实施例 1 中制作校准曲线,不同之处在于使用来自冷却塔的过滤水替代 PBS。

[0083] 将约 50ml 来自冷却塔的水经 PVDF 过滤器 (Millipore SLGV033RB) 过滤以除去残留微生物。将 10ml 经过滤的水用作无细胞的空白样。

[0084] 通过平板计数法得到各样品 (无细胞的空白样、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$ ) 的总荧光假单胞菌的浓度。

[0085] 在  $\Delta$  荧光强度 (RLU) 的对数值和平板计数 (cfu/ml) 的对数值之间进行回归分析以得到如图 2 所示的校准曲线。回归方程为  $y = 0.383 + 0.576x$  ( $R-Sq = 90.7\%$ )。

[0086] 实施例 3

[0087] 使荧光假单胞菌细胞在培养平板上生长过夜且将其加到数个 170  $\mu$ l 的磷酸盐缓冲盐水样品中。将各样品与 20  $\mu$ l 10X SYBR®Green I 染料 (得自 Molecular Probes) 和 10  $\mu$ l 20X CyQUANT™ 裂解缓冲液混合。

[0088] 在 497nm 的激发波长和 520nm 的发射波长下测定各样品的荧光强度。对于各样品

测定荧光四次并取平均值以得到荧光基线信号。

[0089] 将样品在 60°C 下加热 2 分钟,随后冷却到室温。在 497nm 的激发波长和 520nm 的发射波长下测定各样品的荧光强度。对于各样品测定荧光四次并取平均值以得到第二荧光信号。

[0090]  $\Delta$  荧光强度 ( $\Delta$ ) 通过从第二荧光信号中减去荧光基线信号得到。根据实施例 1 中制作并在图 3 中示为样品 1 的校准曲线使  $\Delta$  荧光强度测定的对数值等同于细胞浓度 (cfu/ml)。图 3 图示了对于在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中稀释的荧光假单胞菌的细胞浓度 (cfu/ml) 和 ATP 生物发光的测定读数与细胞稀释度的关系。

[0091] 对比测试也通过平板计数和 Bioscan™ ATP 对各样品进行。对各测试进行四次测定且取平均值并示于图 3 中。平板计数和样品 1 结果以对数浓度记录且 ATP 结果以原始浓度记录。ATP 结果对于相同标准具有 1-log 变化且结果对于用于定量比较来说太嘈杂。

[0092] 样品 1 进行 5 分钟或更短时间且可以良好准确度测定低至  $10^4$  cfu/ml 的浓度。其与传统基于培养基的方法具有类似变化 (标准偏差 / 平均值) 和良好相关性,且与工业 Bioscan™ ATP 方法相比具有好得多的检测极限和较小变化。

[0093] 实施例 4

[0094] 使荧光假单胞菌细胞在培养平板上生长过夜且将其加到数个 170  $\mu$  l 经热压处理以除去残留微生物的油田水 (field water) 样品中。

[0095] 将各样品与 20  $\mu$  l 10X SYBR® Green I 染料 (得自 Molecular Probes) 和 10  $\mu$  l 20X CyQUANT™ 裂解缓冲液混合。

[0096] 在 497nm 的激发波长和 520nm 的发射波长下测定各样品的荧光强度。对于各样品测定荧光四次并取平均值以得到荧光基线信号。

[0097] 将样品在 60°C 下加热 2 分钟,随后冷却到室温。在 497nm 的激发波长和 520nm 的发射波长下测定各样品的荧光强度。对于各样品测定荧光四次并取平均值以得到第二荧光信号。

[0098]  $\Delta$  荧光强度 ( $\Delta$ ) 通过从第二荧光信号中减去荧光基线信号得到。根据实施例 2 中制作的校准曲线使  $\Delta$  荧光强度测定的对数值等同于细胞浓度 (cfu/ml) 且在图 4 中示为样品 2。图 4 图示了对于在油田水中稀释的荧光假单胞菌的细胞浓度 (cfu/ml) 和 ATP 生物发光的测定读数与细胞稀释度的曲线。

[0099] 对比测试也通过平板计数和 Bioscan™ ATP 对各样品进行。对各测试进行四次测定且取平均值并示于图 4 中。平板计数和样品 2 结果以对数浓度记录且 ATP 结果以原始浓度记录。ATP 结果对于相同标准具有 1-log 变化且结果对于用于定量比较来说太嘈杂。

[0100] 样品 2 进行 5 分钟或更短时间且可以良好准确度测定低至  $10^4$  cfu/ml 的浓度。其与传统基于培养基的方法具有类似变化 (标准偏差 / 平均值) 和良好相关性,且与工业 Bioscan™ ATP 方法相比具有好得多的检测极限和较小变化。

[0101] 实施例 5

[0102] 对于冷却塔水中的荧光假单胞菌和在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的荧光假单胞菌制作校准曲线。将约 50ml 来自冷却塔的水热压处理以除去残留的微生物。

[0103] 使荧光假单胞菌细胞在液体培养基中生长过夜并将其加到 10ml 热压处理的冷却塔水中以形成初始样品。从初始样品进行连续稀释。将 0.1ml 初始样品加到 9.9ml 热压处

理的冷却塔水中以制得 1% ( $10^{-2}$ ) 溶液。将 1ml 的 1% 溶液加到 9ml 热压处理的冷却水中以制得 0.1% ( $10^{-3}$ ) 溶液。将 1ml 的 0.1% 溶液加到 9ml 热压处理的冷却水中以制得 0.01% ( $10^{-4}$ ) 溶液。将 1ml 的 0.01% 溶液加到 9ml 热压处理的冷却塔水中以制得 0.001% ( $10^{-5}$ ) 溶液。将 10ml 的热压处理的冷却塔水用作空白样。

[0104] 将荧光假单胞菌细胞加到 10ml PBS 中以形成初始样品。如对于冷却塔水一样从初始样品进行连续稀释以制得  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$  的 PBS 溶液。将 10ml PBS 用作空白样。

[0105] 留出来自各水和 PBS 连续稀释的样品用于测定水样品中的本底噪声。将各本底样品用由 1ppm 氯气和 20ppm Bellacide<sup>®</sup> 350 组成的杀生物剂处理 30 分钟。加入 200ppm 亚硫酸氢钠以中和残留氯。

[0106] 从各稀释的冷却塔水 PBS 样品和本底样品取得 170  $\mu$ l 样品。将各样品与 20  $\mu$ l 110X SYBR<sup>®</sup> Green I 染料 (得自 Molecular Probes) 和 10  $\mu$ l 20X CyQUANT<sup>™</sup> 裂解缓冲液混合。

[0107] 在 497nm 的激发波长和 520nm 的发射波长下测定各冷却塔水和 PBS 样品的荧光强度。对于各样品测定荧光四次并取平均值以得到荧光 I 信号。在 497nm 的激发波长和 520nm 的发射波长下测定各本底冷却塔水的荧光强度。对于各样品测定荧光四次并取平均值以得到本底荧光 I 信号。

[0108] 将样品在 60°C 下加热 2 分钟, 随后冷却到室温。在 497nm 的激发波长和 520nm 的发射波长下再次测定各冷却塔水和 PBS 样品的荧光强度。对于各样品测定荧光四次并取平均值以得到荧光 II 信号。对于各本底冷却塔水样品在 497nm 的激发波长和 520nm 的发射波长下测定荧光强度。对于各样品测定荧光四次并取平均值以得到本底荧光 II 信号。净荧光强度通过从荧光 II 信号减去荧光 I 信号得到。对于各冷却塔水和 PBS 样品得到净荧光测定值。

[0109] 净本底荧光强度通过从本底荧光强度 II 信号减去本底荧光强度 I 信号得到。对于各本底样品得到净本底荧光测定值。

[0110] 对于各样品, 经调整的净荧光信号通过从净荧光信号中减去净本底荧光信号得到。

[0111] 对于各冷却塔水和 PBS 样品, 使用标准平板计数法得到总荧光假单胞菌的浓度。

[0112] 对于冷却塔水和 PBS, 在经调整的净荧光信号 (RLU) 的对数值和平板计数 (cfu/ml) 的对数值之间进行回归分析以得到校准曲线, 如图 5 所示。PBS 校准曲线的回归方程为  $y = -1.47 + 0.847x$  ( $R-Sq = 92.2\%$ )。对于冷却塔水的回归方程为  $y = -1.29 + 0.741x$  ( $R-Sq = 73.7\%$ )。从 165 个数据点中删除 3 个异常值。

[0113] 实施例 6

[0114] 如实施例 1 中制作校准曲线, 不同之处在于细菌为绿脓假单胞菌细胞并使其在胰酶大豆肉汤 (tryptic soy broth; TSB) 液体培养基中生长过夜并将其加到 10ml 0.85% 盐水缓冲液中以形成初始样品。

[0115] 从初始样品进行连续稀释。将 0.1ml 初始样品加到 9.9ml 0.85% 盐水缓冲液中以制得 1% ( $10^{-2}$ ) 溶液。将 1ml 的 1% 溶液加到 9ml 0.85% 盐水缓冲液中以制得 0.1% ( $10^{-3}$ ) 溶液。将 1ml 的 0.1% 溶液加到 9ml 0.85% 盐水缓冲液中以制得 0.01% ( $10^{-4}$ ) 溶液。将 1ml 的 0.1% 溶液加到 9ml 0.85% 盐水缓冲液中以制得 0.001% ( $10^{-5}$ ) 溶液。将 10ml 0.85% 盐水缓冲液用作无细胞的空白样。

[0116] 从稀释的样品和无细胞的空白样中各自取得 180  $\mu$  l 且将各样品与 20  $\mu$  l 10XSYBR<sup>®</sup>Green I 染料混合。通过 LS55 发光光谱仪 (PerkinElmer) 在 497nm 的激发波长和 520nm 的发射波长下测定各样品 (无细胞的空白样、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$ ) 的荧光强度。对于各样品测定荧光四次并取平均值以得到基线荧光测定值。

[0117] 将样品加热到 90°C 历时 2 分钟, 随后冷却到室温。在 497nm 的激发波长和 520nm 的发射波长下测定荧光强度以得到荧光强度 II 测定值。对于各样品测定荧光四次并取平均值以得到荧光强度 II 测定值。

[0118]  $\Delta$  荧光强度通过从荧光强度 II 信号减去基线荧光信号计算。

[0119] 对于各样品 (无细胞的空白样、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$ ) 使用标准平板计数法得到总绿脓假单胞菌细胞的浓度。

[0120] 在  $\Delta$  荧光强度 (RLU) 的对数值和平板计数 (cfu/ml) 的对数值之间进行回归分析以得到如图 6 所示的校准曲线。回归方程为  $y = -1.0185 + 0.7381x$  ( $R-Sq = 98.97\%$ )。

[0121] 绿脓假单胞菌生物膜细胞通过提供液体生长介质、具有 1% 细菌接种体的 30% TSB 介质 (过夜培养) 的再循环流以 135ml/min 流速经过循环线路中的管道而在 316 不锈钢管道内表面上生长过夜。

[0122] 在所需时间间隔之后, 将 316 不锈钢管段从流动体系中除去。生物膜累积物通过将 316 不锈钢管段浸入 10ml 0.85% 盐水缓冲液中并以最大速度涡旋 2 分钟而去除。

[0123] 将数个 180  $\mu$  l 涡旋样品的等分样品与 20  $\mu$  l 10X SYBR<sup>®</sup>Green I 染料混合。在 497nm 的激发波长和 520nm 的发射波长下测定各样品的荧光强度。对于各样品测定荧光四次并取平均值以得到基线荧光测定值。

[0124] 将样品加热到 90°C 历时 2 分钟, 随后冷却到室温。在 497nm 的激发波长和 520nm 的发射波长下测定各样品的荧光强度。对于各样品测定荧光四次并取平均值以得到荧光强度 II 测定值。

[0125]  $\Delta$  荧光强度通过从荧光强度 II 信号中减去荧光基线信号来计算。将  $\Delta$  荧光强度测定 (RLU) 的对数值沿图 6 中的校准曲线作为样品 3 的数据点绘制。根据图 6 中的校准曲线使各样品的  $\Delta$  荧光强度测定的对数值等同于细胞浓度 (cfu/ml)。

[0126] 根据图 6, 可以看出来自绿脓假单胞菌生物膜细胞 (样品 3) 的所有数据点与从浮游的绿脓假单胞菌细胞悬浮液得到的校准曲线完全对准, 这表明该测定适合在从固体表面分散生物膜之后进行生物膜量化。

[0127] 现参看图 7, 图示了根据上述方法用于监测水体系的水介质中总细菌含量的体系且通常以参考数字 100 提到。图 7 中所示的实施方案图示具有流经循环回路 104 的水介质的常规开放式再循环冷却塔水体系 102。水介质流经循环回路 104 可通过本领域已知的循环泵 106 加速。阀门 108 容许水介质从循环回路 104 进料到总细菌监测体系 100。总细菌监测体系 100 充当在线分析器以监测水体系 102 的水介质中的细菌浓度。本领域技术人员将理解总细菌监测体系 100 可用来通过测定任何城市或工业用水或工艺体系 102 中的总细菌提供总活细菌的快速检测。因此, 本文中不必提供水体系 102 的更多细节。

[0128] 进入总细菌监测体系 100 的水介质首先通过过滤器组件 110。理想地, 过滤器组件 110 包括过滤器 112, 其具有约 5- 约 50 微米的孔径, 使得较大杂质从水介质中除去, 但细菌内容物通过留在滤液中。在一个实施方案中, 过滤器组件 110 为触发器 (flip/flop) 型

过滤体系,诸如 2008 年 8 月 18 日提交的题为“*In-Line Filtration Systems (在线过滤体系)*”的共同受让的美国专利申请第 12/193,198 号中公开的过滤体系,过滤器孔径为 10 微米。然而,在不偏离本发明的范围的情况下,过滤器组件 110 可包括其他过滤器布局。

[0129] 总细菌监测体系 100 包括控制组件 120、样品制备组件 130、裂解组件 140 和检测组件 150。控制组件 120 含有可编程的逻辑控制器 122 或类似装置和用于控制其他组件 130、140、150 的功能的电子单元 124,且另外如下所述计算总细菌浓度。

[0130] 样品制备组件 130 由液位开关样品杯 132 和用以控制过滤后的水介质流进样品杯 132 的电磁阀 133 构成。在一个实施方案中,液位开关样品杯 132 包含一对导线。当样品杯 132 充满时或处于指定高液位时,两根线电连接,这触发电磁阀 133 关闭。当样品杯 132 变空或处于指定低液位时,两根线断开,这触发电磁阀 133 开启。这两种状态之间的死区 (dead band) 理想地为约 1.5ml。样品制备组件 130 使水介质的压力从循环回路 104 中的集管压力下降到大气压力。理想地,样品杯 132 对大气开放,以使得水介质中的所有气泡经排气口 134 从样品中逸出。如本领域技术人员将理解,水介质中的气泡将从检测组件 150 中使用的光学测定装置中引起不必要的刺突 (spike)。

[0131] 诸如微正排量泵的样品泵 135 从样品杯 132 中取出水介质。通过降低压力,保护样品泵 135,因为样品泵仅可定速为约 5psig。水介质经样品制备组件 130 的进料速率使用样品泵 135 控制。可编程的逻辑控制器 122 设定样品泵 135 的振动频率以准确控制流量。水介质的流量理想地为约 100  $\mu$ L-约 250  $\mu$ L,更理想地为 150  $\mu$ L-约 200  $\mu$ L。在一个实施方案中,样品泵 137 为由 Beion Medical Technology Co 制造的 150SP-S2 型。然而,可使用能够准确泵送小体积水介质的任何已知泵。

[0132] 在所说明的实施方案中,将荧光色素试剂与缓冲剂预混合并将其从试剂供应 136 一起加到水介质中。或者,本领域技术人员将理解可在将荧光色素加到水介质中之前或之后加入缓冲剂。试剂供应 136 借助于试剂进料泵 137 进料荧光色素和缓冲剂。试剂进料泵 137 还理想地为微正排量泵且可编程的逻辑控制器 122 设定其振动频率以准确控制流量。理想地,试剂进料泵 137 以约 0.5mg-约 100mg 荧光色素 /L 水介质的量加入荧光色素。将缓冲剂加到水介质中以将水介质的 pH 保持为约 2-约 10。在一个实施方案中,试剂泵为由 Beion Medical Technology Co 制造的 120SP-S2 型。

[0133] 通过样品泵 135 泵送的水介质和通过试剂进料泵 137 泵送的试剂使用提供促进水介质、荧光色素试剂和缓冲剂混合的湍流路径的混合丁字接头 138 (泛称:混合装置) 组合。在不偏离本发明的范围的情况下,也可以使用其他混合装置,诸如混合十字管或叶轮。

[0134] 在所说明的实施方案中,裂解组件 140 通过加热水介质实现了裂解。水介质样品制备组件 130 通到裂解组件 140 或使用受控制组件 120 控制的三通阀 141 直接通到检测组件 150,因此绕过裂解组件 140。在一个实施方案中,裂解组件 140 包括使水介质的温度升高和降低以裂解细胞并释放微生物物质的胞内内容物的温度控制单元 142。温度控制组件 142 包括用以加热水介质的加热装置 144,诸如半导体板或其他已知加热元件。在细胞已经裂解之后使用风扇或其他辐射器 146 促进样品快速冷却。在加热和冷却期间,热电偶 148 测定水介质的温度。控制组件 120 控制并供应动力到温度控制单元 142 以将样品加热到所要温度使细胞裂解,随后使用预定控制程序冷却样品,直到达到所要温度。理想地,温度控制单元 142 将水介质加热到约 40°C - 约 100°C、更理想地约 40°C - 约 60°C 的温度。温度控



制单元 142 理想地在约 1 分钟 - 约 1 小时、更理想地约 1 分钟 - 约 3 分钟的时间内将水介质加热到所要温度,以裂解细胞。本领域技术人员将理解温度控制单元 142 根据需要可含有用以加热和冷却水介质的其他已知设备。另外,如上所述,在不偏离本发明的范围的情况下,裂解组件 140 可使用诸如机械、化学、物理、电力、超声或微波方法的其他已知裂解方法来裂解细胞。

[0135] 随后将含有裂解的生物内容物的水介质经三通阀 149 引导到检测组件 150。检测组件 150 包括光学测定单元 152。使用多于一个光学测定单元可加强测定准确度。光学测定单元 152 包括硅玻璃流动池 154 和单波长荧光计 156。硅玻璃流动池 154 具有分别安装在流动池底部和顶部的入口流管 158 和出口流管 159。如图 8 中图示的示意性实施方案最佳地所见到的,荧光计 156 包括经构造围绕反应管 163 的至少一对发光二极管(LED)160 和光电二极管发射检测器 162。理想地,荧光信号用具有约 350nm- 约 600nm 的激发波长和约 450nm- 约 650nm 的发射波长的荧光计测定。另外,荧光计 156 包括在密封的光学管中用以控制光程和强度的光学透镜 164 和滤光器 165。在一个实施方案中,荧光计 156 为 PerkinElmer 制造的 LS55 发光光谱仪。

[0136] 在包含三对光学组件的一个实施方案中,三个 LED 和 3 个光电二极管安装在垂直于中心通孔的六个径向通道中。三个 LED 产生不同波长的入射光,且三个相应光电二极管在相对侧检测相应透射率。所使用的 LED 包括具有 467nm(蓝色)、530nm(绿色)和 634nm(红色)光的三原色、具有 610nm 最大发射的橙色 LED 和具有 586nm 最大发射的浅绿 LED。该构造简化了光学组件的设计和维修。三对照相光学组件提供了一次测定三种功能的能力。不存在可包括的照相光学组件对的最大数目;然而,该数目将受到基于监测体系的预定用途的大小限制的影响。

[0137] 根据各成套设备的容许需求,来自光学测定单元 152 的包含混合的样品水和试剂的排出物离开检测器组件 150 并连接到排出或收集罐。因为排出物为无危险的废水,所以通常将其排放到自重排水。

[0138] 对控制组件 120 编程,使得在于裂解组件 140 中已提取微生物物质的胞内内容物并将其释放到水介质中之前和之后通过检测组件 150 测定水介质的荧光信号,以分别提供基线荧光信号和第二荧光信号。这些荧光信号通过检测组件 150 测定并储存在可编程的逻辑控制器 122 中。将基线荧光信号从第二荧光信号中减去以得到作为裂解细胞的微生物含量结果的净荧光信号。如上所述使用校准曲线以得到总微生物含量。如上说明,校准曲线通过测定具有荧光色素的水介质中已知浓度的微生物物质荧光信号、确定各浓度的净荧光信号、绘制浓度量与净荧光信号的对数值的关系曲线并进行回归分析以得到校准曲线来制作。上述特点使得所述体系可以在线方式监测总细菌。

[0139] 虽然已经出于说明目的陈述了典型实施方案,但是不应将上述描述视为对本文中范围的限制。因此,本领域技术人员可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下想到改变、改进和替代。

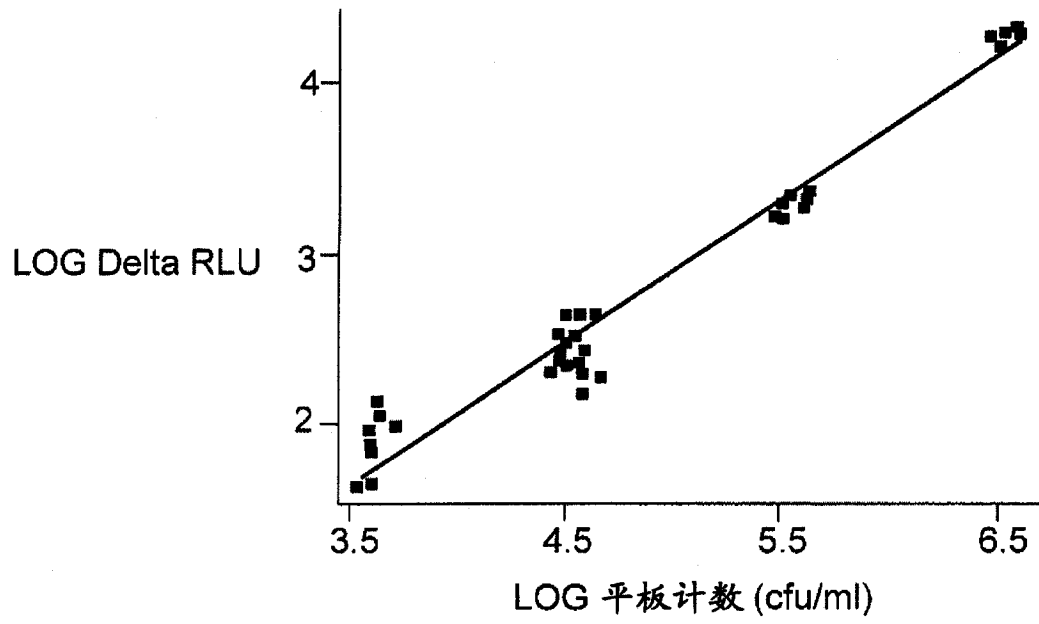


图 1

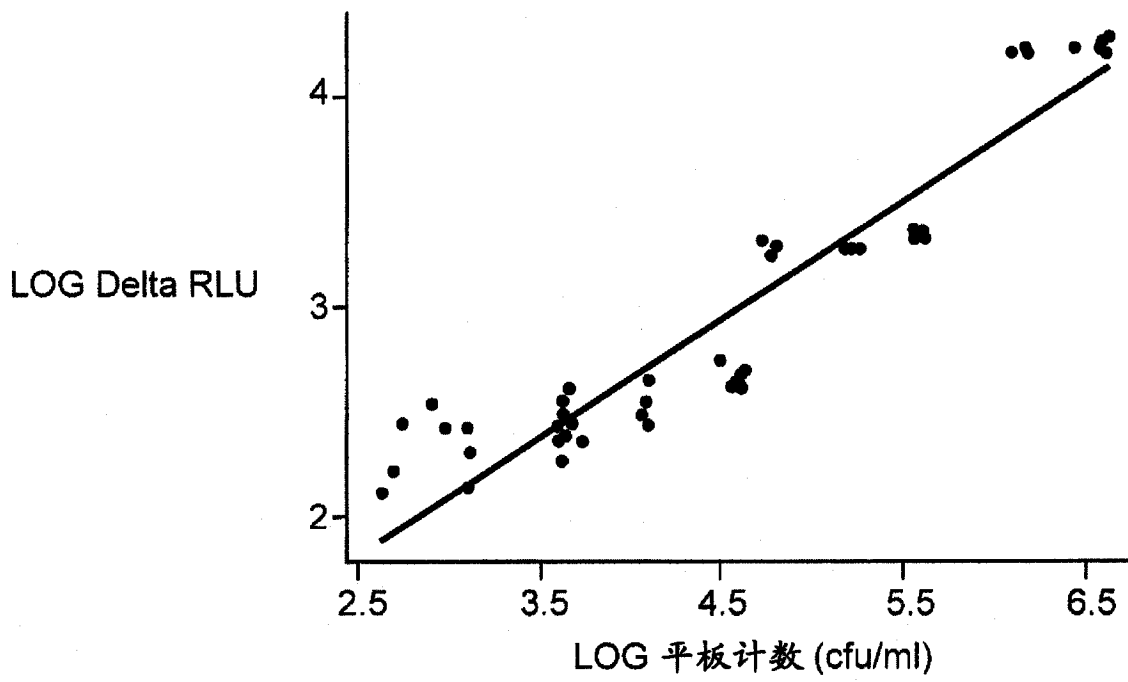


图 2

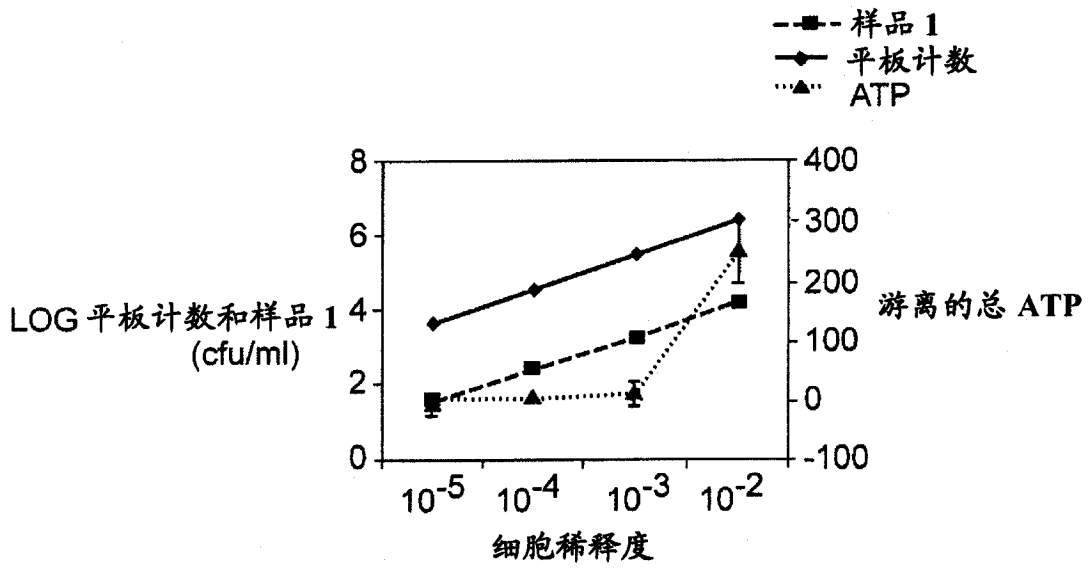


图 3

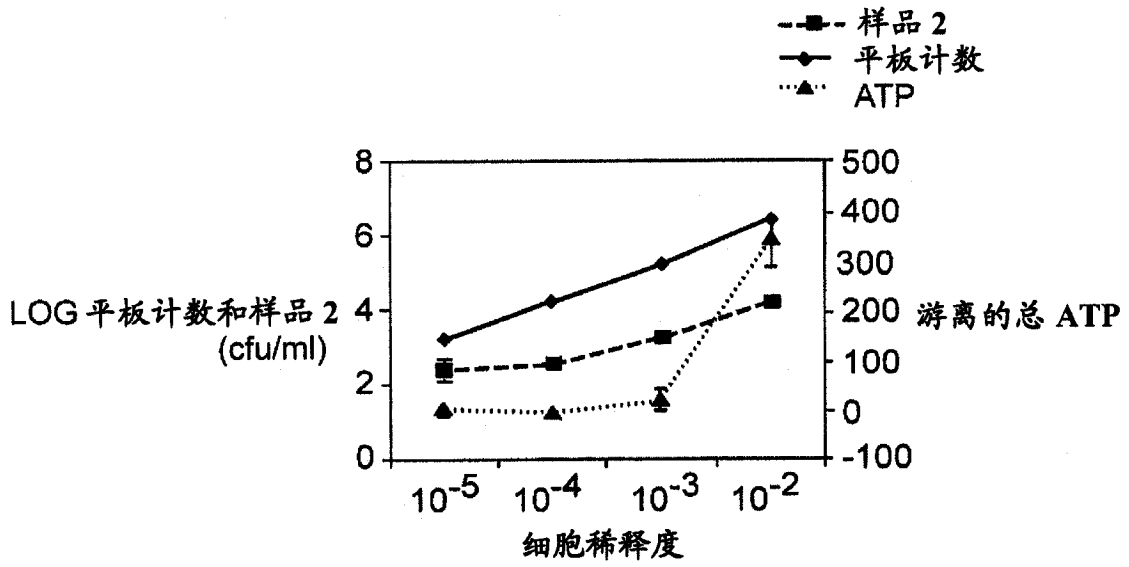


图 4

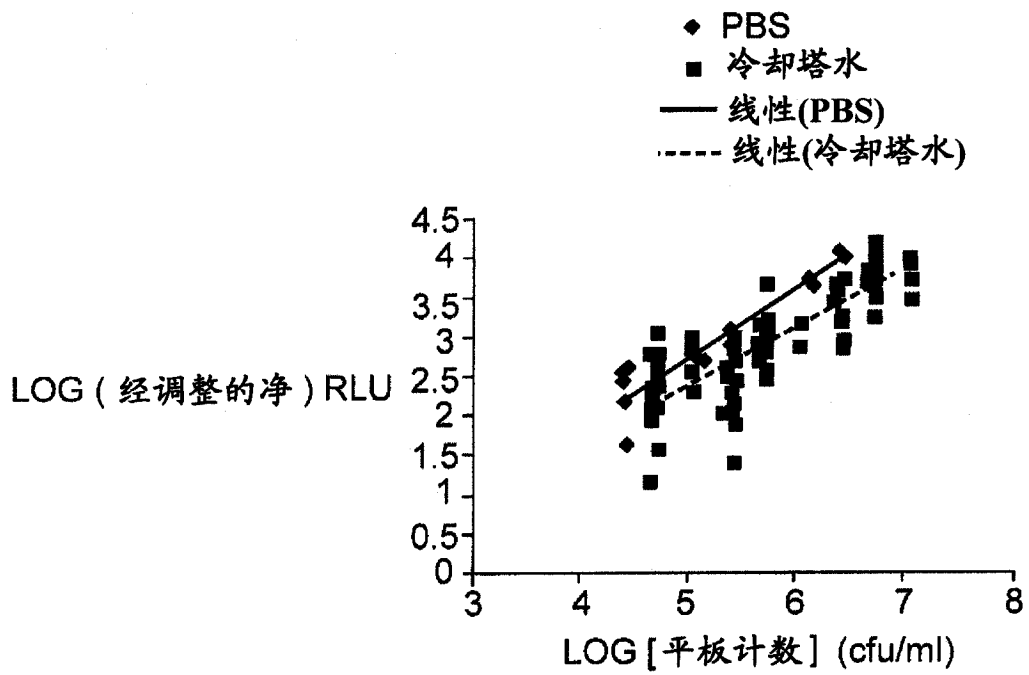


图 5

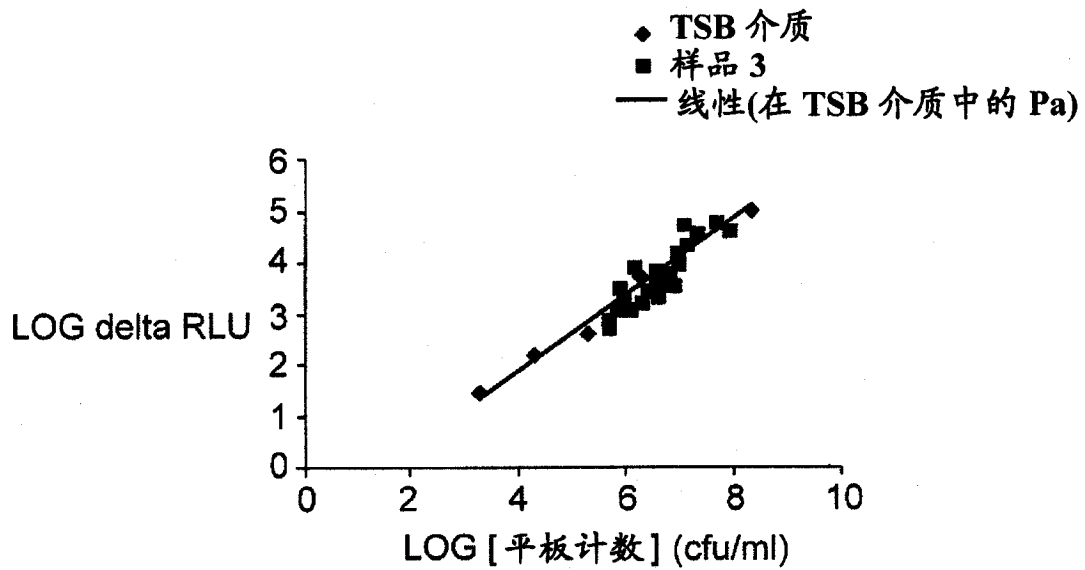


图 6

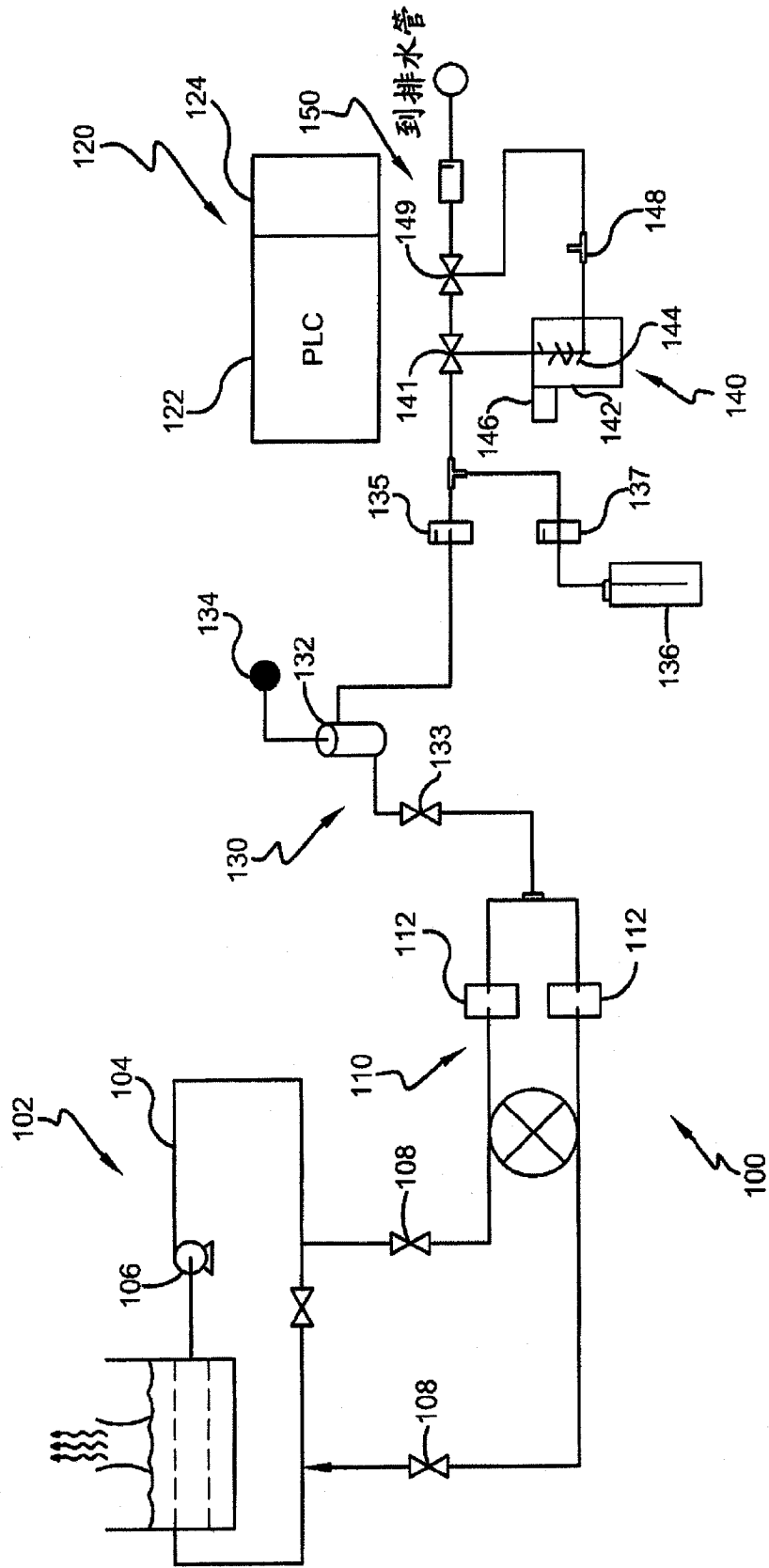


图 7

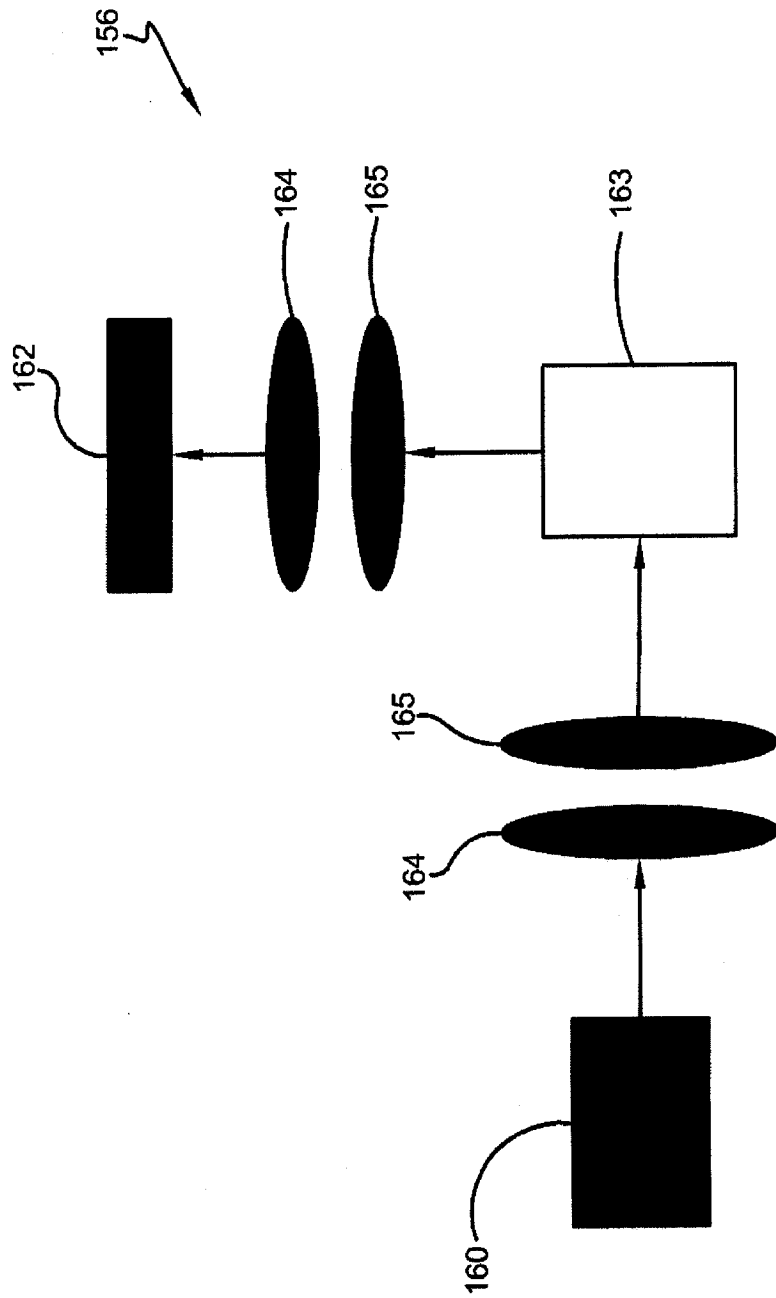


图 8