

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1957089 B

(45) 授权公告日 2013.05.29

(21) 申请号 200580009643.1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2005.02.28

C12Q 1/24 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12Q 1/04 (2006.01)

PA200400348 2004.03.01 DK
60/549, 158 2004.03.03 US

C12Q 1/34 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2006.09.25

EP 0574977 A1, 2003.12.22, 说明书第4、
6-8栏。

(86) PCT申请的申请数据

WO 03012397 A1, 2003.02.13, 权利要求1、
16.

PCT/DK2005/000137 2005.02.28

马绪荣等. 药品微生物学检验手册 1. 科
学出版社, 2000, 第一篇第一章 20-21页.

(87) PCT申请的公布数据

审查员 田甜

W02005/083109 EN 2005.09.09

(73) 专利权人 麦卡米特私人有限公司

地址 丹麦哥本哈根

(72) 发明人 M·里斯勒夫 M·米勒

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 李瑛

权利要求书3页 说明书12页 附图3页

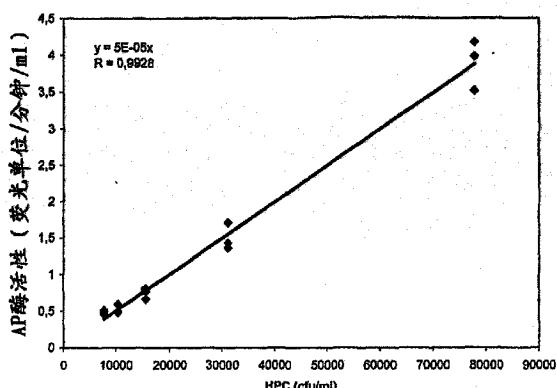
(54) 发明名称

污染测量

(57) 摘要

CN 1957089 B

公开了用于怀疑包含污染物的介质的简便的样品制备方法, 该方法包括 a) 使已知体积的所述介质从流入侧至流出侧通过滤器, 由此将污染物集中在滤器的流入侧上, b) 使滤器的流入侧与包含至少一种底物的液体载体接触, 所述底物通过与污染物相互作用产生可检测的部分, 和 c) 允许底物与滤器流入侧上的污染物相互作用一段时间, 其足以允许检测液体载体中的可检测部分。该方法可进一步包括检测步骤, 其中可检测的量在液体载体中测定, 优选在该液体载体已与污染物分离后, 例如通过使液体载体通过滤器并且对无污染物的液体载体进行测量。还公开了用于使用本发明方法的试剂盒。



1. 用于怀疑包含污染物的介质的样品制备方法,该方法包括 a) 使已知体积的所述介质从过滤装置中的流入侧至流出侧通过滤器,由此将污染物集中在过滤装置中的滤器的流入侧上, b) 使过滤装置中的滤器的流入侧与包含至少一种底物的液体载体接触,所述底物通过与污染物相互作用产生可检测的部分,和 c) 允许底物与过滤装置中滤器流入侧上的污染物相互作用一段时间,其足以允许检测液体载体中的可检测部分,所述方法不包括培养步骤。
2. 权利要求 1 的方法,其中,在步骤 a 之前,使介质通过不留污染,但保留大颗粒的预过滤器。
3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中该污染物选自细菌;真菌;藻类;原生动物;来自细菌的孢子;真菌孢子;以及花粉和其碎片。
4. 根据权利要求 3 的方法,其中所述真菌是丝状真菌和酵母。
5. 根据权利要求 1 的方法,其中该介质为液体介质。
6. 根据权利要求 5 的方法,其中该液体介质选自环境水、饮用水、工业用水、工艺用水、固体材料的液体提取物、悬浮或溶解的表面样品以及液体工业产品。
7. 根据权利要求 6 的方法,其中所述的饮用水是热水。
8. 根据权利要求 6 的方法,其中所述的工业用水、工艺用水是适当位置的清洗用水。
9. 根据权利要求 6 的方法,其中所述的工业产品是化妆品、药物和食品。
10. 根据权利要求 5-9 任一项的方法,其中该液体介质的粘度在步骤 a 之前降低。
11. 根据权利要求 10 的方法,其中粘度通过稀释的方法或通过用化学试剂处理的方法降低。
12. 根据权利要求 11 的方法,其中所述的化学试剂是溶解度增强剂或去污剂。
13. 根据权利要求 1 的方法,其中该介质为气体介质。
14. 根据权利要求 13 的方法,其中该气体介质为空气。
15. 根据权利要求 14 的方法,其中所述的空气是来自无菌设备、层状气流装置的空气或环境空气。
16. 根据权利要求 1 的方法,其中该滤器具有足够小以便保留介质中所有污染物的孔径大小。
17. 根据权利要求 16 的方法,其中该滤器具有足够大以允许让可检测部分流过滤器的孔径大小。
18. 根据权利要求 17 的方法,其中该孔径大小为至多 20 μm 。
19. 根据权利要求 17 或 18 的方法,其中该孔径大小为至少 0.1 μm 。
20. 根据权利要求 1 的方法,其中该至少一种底物通过被酶裂解而产生可检测部分,其为该污染物的特性。
21. 根据权利要求 20 的方法,其中所述的酶选自糖酶、蛋白酶、酯酶、酰胺酶和磷酸酶。
22. 根据权利要求 21 的方法,其中所述的酶是脂肪酶。
23. 根据权利要求 21 的方法,其中所述的酶是核酸酶。
24. 根据权利要求 21 的方法,其中所述的酯酶是硫酸酯酶。
25. 根据权利要求 21 的方法,其中所述的磷酸酶是碱性磷酸酶。
26. 根据权利要求 20 或 21 的方法,其中该酶由微生物组成型表达。

27. 根据权利要求 20 的方法, 其中该至少一种底物为产生作为可检测部分的蓝色、绿色和红色荧光产物的荧光生成或显色底物。

28. 根据权利要求 20 的方法, 其中该至少一种底物选自 5- 溴代 -4- 氯代 -3- 吡啶基磷酸二钠盐 ;9h-(1,3- 二氯 -9,9- 二甲基吖啶 -2- 酮 -7- 基) 磷酸铵盐 ; 荧光素二磷酸四铵盐 ; 甲基伞形基衍生物 ;4- 硝基苯基磷酸的盐 ; 和 9- 羟基 -3- 异吩噁唑酮磷酸。

29. 根据权利要求 28 的方法, 其中所述的甲基伞形基衍生物选自 6,8- 二氟 -4- 甲基伞形基磷酸, 4- 甲基伞形基磷酸二环己基铵盐三水合物, 4- 甲基伞形基磷酸游离酸, 4- 甲基伞形基磷酸二锂盐, 4- 甲基 伞形基 -β-N- 乙酰氨基葡萄糖苷和三氟甲基伞形基磷酸。

30. 根据权利要求 20 的方法, 其中该可检测部分在最多 100 皮摩尔的量时为可检测的。

31. 根据权利要求 20 的方法, 其中该可检测部分在最多 50 皮摩尔的量时为可检测的。

32. 根据权利要求 20 的方法, 其中该可检测部分在最多 20 皮摩尔的量时为可检测的。

33. 根据权利要求 20 的方法, 其中该可检测部分在最多 10 皮摩尔的量时为可检测的。

34. 根据权利要求 20 的方法, 其中该可检测部分在最多 1 皮摩尔的量时为可检测的。

35. 根据权利要求 1 的方法, 其中利用至少两种底物, 其产生提供信号的可检测部分, 所述信号可结合成一种单一测量的信号值。

36. 根据权利要求 1 的方法, 其中利用至少两种底物, 其产生提供可辨别信号的可检测部分。

37. 根据权利要求 1 的方法, 其中该污染物为有活力的微生物。

38. 根据权利要求 1 的方法, 其中液体载体中底物的量并不限制可检测部分的产量。

39. 根据权利要求 38 的方法, 其中该可检测部分的产量为已知体积介质中污染物数量的函数。

40. 根据权利要求 39 所述的方法, 其中该函数为线性的。

41. 根据权利要求 1 的方法, 其中几种不同已知体积的介质在步骤 a 中各自通过滤器, 以确保至少一种体积包含合适数量的污染物。

42. 根据权利要求 1 的方法, 其中该滤器为封闭的、无菌过滤装置的一部分。

43. 根据权利要求 42 的方法, 其中该封闭的、无菌过滤装置为一次性的。

44. 根据权利要求 42 或 43 的方法, 其中该封闭的、无菌过滤装置将滤器和过滤器套整合为一个不可逆封闭的结构单元。

45. 根据权利要求 42 的方法, 其中该封闭的、无菌过滤装置的最长截面轴不超过 10cm 的长度。

46. 根据权利要求 1 的方法, 其中步骤 c 中的相互作用通过中断底物和污染物之间的接触而终止。

47. 根据权利要求 46 的方法, 其中中断通过从过滤装置排空液体载体而保留污染物在该过滤装置中而达到。

48. 根据权利要求 47 的方法, 其中该液体载体以从滤器的流入至流出侧方向从该过滤装置排空。

49. 根据权利要求 48 的方法, 其中排空通过对滤器的流入侧增加压力或通过对滤器的流出侧降低压力而达到。

50. 根据权利要求 1 的方法, 其中步骤 c 中的相互作用在滤器上终止或其中不终止该相

互作用。

51. 根据权利要求 1 的方法, 步骤 c 后包括另外的步骤 d), 其需要定量或定性检测液体载体中的可检测部分以及将该部分的检测与样品中污染物的量或存在相关联。

52. 根据权利要求 51 的方法, 其中步骤 d 中的检测通过测定可检测部分所特有的荧光来进行。

53. 根据权利要求 52 的方法, 其中步骤 d 中的荧光是在不中断液体载体和污染物间接触的情况下直接对液体载体测量的。

54. 根据权利要求 51 的方法, 其中步骤 d 中的关联包括表示在标准条件下污染物量和可检测部分量之间关系的预测定标准曲线的利用。

55. 根据权利要求 51 的方法, 其中检测在微量滴定系统中进行。

56. 根据权利要求 1 的方法, 其中该污染物在步骤 a 之前或步骤 b 中受到信号增强影响。

57. 根据权利要求 56 的方法, 其中该信号增强影响提高随后检测中的总灵敏度或有助于随后特定类型污染物的检测或降低特定类型污染物的检测。

58. 根据权利要求 56 的方法, 其中该信号增强影响选自酶增强物质、选择性的温度或温度范围、选择性的 pH、选择性的盐浓度、非选择性的生长增强剂和选择性的生长增强物质。

59. 根据权利要求 1 的方法, 其中步骤 a 之前经过介质的温育。

60. 根据权利要求 59 的方法, 其中该温育需要

- 用酶诱导物质处理, 由此增强可检测部分的检测, 和 / 或
- 使该介质经受用于酵母、真菌或细菌的选择性物质, 和 / 或
- 使该介质经受用于微生物的非选择性生长增强剂, 和 / 或
- 使该介质经受能够提取细胞酶的物质。

污染测量

发明领域

[0001] 本发明涉及环境监视和控制的领域,尤其涉及环境样品中污染物的测定。更具体地,本发明涉及提供精确的(微生物的)污染测量的简单、多用途、实用、可靠和快速的方法,其可就地进行。本发明进一步提供可用于进行所述测量的试剂盒。

[0002] 发明背景

[0003] 为了应对细菌污染的问题,已开发了几种检验方法。经典方法基于细菌在支持生长的营养培养基上的培养。大约2-14天后,能在固体培养基上生长的细菌已繁殖至菌落可见并且可计数的水平,而能在液体培养基中生长的细菌可通过例如光密度或干重而测量。已取得一些成就以加快和简化检测过程。这些成就为基于放射性测量、阻抗、化学发光和荧光测量的方法。

[0004] 用于鉴定细菌污染的放射性测量方法通常利用放射性营养物掺入细菌。可分离放射性标记的细菌并通过跟随放射性标记进行定量。该方法具有一些不合要求的缺点。虽然很灵敏,但其利用昂贵和难处理的放射性同位素。

[0005] 基于电阻抗的方法通常包括培养步骤。微生物生长时,可检测营养培养基阻抗的变化并且与微生物生长相关联。基于电阻抗的方法,虽然比经典培养法更快速,但仍是缓慢的,包括1-4天的温育期。

[0006] ATP通过化学发光检测。通过利用ATP检测的细菌检测和/或定量是快速的并且可在几分钟内完成。然而,ATP是普遍存在的并且ATP来源的发光动力学是复杂的,该性质降低了基于该原理方法的实用性。此外,细胞中ATP的周转非常快速并且细胞的ATP含量可在短时期中经历极大的变化,例如当细胞从生长走向饥饿时。

[0007] 现有技术中已描述了几种方法,其以在伴随的源自释放的伞形酮的荧光监测下荧光标记的伞形酮底物的酶促降解为基础。通过利用酶活性的细菌检测或定量还可能受非细菌来源干扰的影响,虽然该干扰似乎不太显著。此外,每时间单位形成的产物(荧光)量是线性的。降到最低的干扰和简单的动力学使得通过利用酶活性的细菌测量更加实用。

[0008] 美国专利No.4,591,554(Koumura等)公开了利用无荧光伞形酮衍生物快速检测微生物的方法,该衍生物如4-甲基-伞形基(umbelliferyl)- β -D-半乳糖苷、4-甲基伞形基- α -D-半乳糖苷、4-甲基伞形基-磷酸盐和4-甲基伞形基-焦磷酸盐。释放的伞形酮部分的荧光在360nm处诱发并且在450nm处监测。通过1-12小时的培养步骤获得灵敏度的增强。

[0009] 美国专利No.5,518,894(Berg)公开了检测大肠菌类细菌存在的快速方法。该方法包括与培养步骤结合的富集步骤(过滤)以提高存在的靶细菌的数量。监测作为大肠菌类细菌存在指征的水解伞形酮衍生物的荧光。

[0010] 美国专利No.5,610,029(Ehrenfeld等)公开了用于检测样品中靶微生物存在或缺乏的培养基。该培养基包括各种营养物和生长因子,以及荧光代谢物(4-甲基伞形基- β -D-葡萄糖苷酸)。

[0011] 所有上述基于检测酶活性荧光生成检测的方法利用培养步骤,该步骤通常导致

6-72 小时的总工作时间,其在很多情况下不满足快速方法进行的要求,更不用说就地进行的方法。

[0012] 美国专利 No. 5, 089, 395(Snyder 等)公开了无荧光伞形酮衍生物的利用,其经酶促转化为荧光产物以检测细菌的存在。该方法中无培养或富集步骤。由于缺乏这些步骤,该方法灵敏度不高并且需要至少 1000/ml 细菌的高浓度并且通常获得更高的浓度。

[0013] 美国专利 No. 5, 968, 762(Jadamec 等)公开了利用无荧光伞形酮衍生物的方法,其经酶促转化为荧光产物以检测细菌的存在。本发明涉及测量代谢的荧光产物在特定波长与可代谢的荧光偶联物在第二个特定波长的荧光强度比。为了检测 310(cfu/ml) 的浓度,给予约 80 分钟的检测时间 (cfu = 菌落形成单位)。

[0014] 液体样品的膜过滤通常用于检查液体样品中的细菌。无菌膜滤器置于可经过灭菌的封闭装置中,并且在滤器上收集细菌。该滤器随后可置于包含琼脂的营养培养基上,其中可在培养过程之后计数菌落。滤器还可用荧光生成染料处理,该染料掺入细菌中,随后可通过激光诱发的荧光计数细菌。所有利用膜过滤的微生物学家都熟知需要当心的地方以保证滤器的无菌操作。当检测少量细菌时,过滤步骤可能很容易引入污染而使得该方法不可靠,并且使其高度依赖于操作者的技能。

[0015] 因此,本领域需要的是检测样品中细菌存在的快速方法,其简便易行,实用并且可靠。

[0016] 发明目的

[0017] 本发明的目的为通过提供用于测定样品中微生物及其他污染物存在的快速、可靠、多用途和实用的方法而克服现有技术中许多上述提及的缺点和不足。

[0018] 发明概述

[0019] 本发明以令人惊讶的验证为基础,即如果代之以通过过滤或类似过滤的方法进行微生物浓集的有效步骤,可完全排除如上所述的培养步骤。此包括优于现有技术的两个主要优点,即其 1) 提高了灵敏度,因此允许检测时间的显著减少和 2) 除去样品中的化合物或颗粒,其可能由于淬火或自发荧光而干扰例如荧光生成的检测或由于源自培养基的交叉反应物质而干扰免疫检测。

[0020] 本发明通常利用一次性的封闭过滤装置,如果过滤之后为培养或激光计数,其将是不适用的。本发明提供在整个分析过程期间样品的简便、实用和可靠的无菌操作。此使得其成为理想的便携式实地方法。

[0021] 微生物和其他污染物可从大体积浓缩而可能进行甚至非常低浓度的快速检测 - 事实上,该方法的灵敏度仅仅通过必须由滤器保留的最小量污染物以及通过滤器的物理性质,即可通过滤器而保持其结构完整性的体积大小来设定。因此,本发明重要的方面为对液体中所需细菌浓度没有下限以便测量活的微生物靶群体 / 细菌的量。因此该方法可用于检测具有至多 1000 个细菌 /ml 量的液体中的细菌,但可能为更低的量,如至多 100 个细菌 /ml, 至多 10 个细菌 /ml 以及甚至少于 1 个细菌 /ml。

[0022] 本发明例如允许来自各种来源以及以各种形式收集的样品的微生物的定量。样品可以为液体;例如饮用水、热水等等,工业用水例如工艺用水和适当位置的清洗 (CIP) 用水样品、制药用水,2) 空气;例如室内空气、工业空气、来自严重受污染工作环境的空气,来自制药生产设备的空气,3) 可提取的固体样品;例如食品、沉积物和植物材料等等,4) 表

面；例如建筑物表面、建筑材料和工作面等等。

[0023] 因此，在其最宽和最全面的范围内，本发明涉及用于怀疑包含污染物的介质的样品制备方法，该方法包括 a) 使已知体积的所述介质从流入侧至流出侧通过滤器，由此集中污染物在滤器的流入侧上，b) 使滤器的流入侧与包含至少一种底物的液体载体接触，所述底物通过与污染物相互作用产生可检测的部分，和 c) 允许底物与滤器流入侧上的污染物相互作用一段时间，所述的一段时间足以允许检测液体载体中的可检测部分。

[0024] 本发明的另一部分为用于测定介质中污染物的试剂盒，该试剂盒包含 1) 至少一个无菌过滤装置，其包含具有足够小以保留污染物在滤器流入侧上的孔径大小的滤器，2) 用于使已知体积的介质通过该滤器的装置，3) 与污染物相互作用时将释放可检测部分的试剂，该可检测部分的量与已和该试剂相互作用的污染物的量相关，和 4) 陈述以下步骤的说明书，a) 获得已知体积的介质和使其通过无菌过滤装置，b) 使滤器的流入侧与该试剂接触，c) 允许该试剂与可能在滤器的流入侧上的污染物相互作用，和 d) 定量检测该可检测的部分。

[0025] 最后，本发明还涉及封闭的、无菌过滤装置作为用于该装置中保留的污染物和当与污染物接触时释放可检测部分的底物间反应的反应容器的用途。

附图说明

[0026] 图 1：显示从每毫升水样中的菌落形成单位报告的饮用水稀释系列中计算的异养平板计数 (HPC) 和以荧光单位 / 分钟 / ml 报告的，通过 AP 酶底物 4- 甲基伞形基磷酸的酶促裂解而产生的荧光所测定的碱性磷酸酶活性 (AP 酶活性) 间线性关系的图。

[0027] 图 2：显示温育时间和以荧光单位 / 分钟 / ml 报告的，通过 AP 酶底物 4- 甲基伞形基磷酸的酶促裂解产生的荧光所测定的 AP 酶活性间线性关系的图。

[0028] 图 3：显示分别以 \log_{10} (荧光单位 / 小时 / 100ml) 和 \log_{10} (荧光单位 / 30 分钟 / 250ml) 报告的，通过 AP 酶底物 4- 甲基伞形基磷酸的酶促裂解产生的荧光测定的可饮用热水中 AP 酶活性和如以 \log_{10} (cfu/ml 水样) 报告的 HPC 间高度显著的正线性相关的图。

[0029] 图 3：显示分别以 \log_{10} (荧光单位 / 小时 / 100ml) 和 \log_{10} (荧光单位 / 30 分钟 / 250ml) 报告的，通过 AP 酶底物 4- 甲基伞形基磷酸的酶促裂解产生的荧光测定的饮用水中 AP 酶活性和如以 \log_{10} (cfu/ml 水样) 报告的 HPC 间高度显著的正线性相关的图。

[0030] 图 5：显示以 \log_{10} (荧光单位 / 小时 / 100ml) 报告的，通过 AP 酶底物 4- 甲基伞形基磷酸的酶促裂解测定的可饮用热水中 AP 酶活性和以 \log_{10} (细菌细胞 / ml) 报告的吖啶橙直接计数 (AODC) 间高度显著的线性相关的图。

[0031] 图 6：显示真菌普通青霉 (*Penicillium commune*) 的孢子生物量 (以 ng 测量的) 和 N- 己糖胺酶活性 (如通过底物 4- 甲基伞形基 - β -N- 乙酰氨基葡萄糖昔的酶促裂解测量的) 间高度显著的线性相关的图。

[0032] 发明的详细公开

[0033] 在下面，将给出许多定义以限定本发明的界限和范围。

[0034] 如此处所用的，术语“污染物”指样品中生物来源的不良组分。污染物非限制性的实例为微生物，致病的和非致病的，以及所述微生物的碎片。非致病的污染物由于当其出现在其中时对产物的质量有害而可能是不良的（实例为受控发酵中的污染微生物、食品中

影响味道和外观等等的污染微生物)。

[0035] “活的”微生物在上下文中为在正确的环境设置下为或可变为代谢活性的微生物或孢子。因此该术语在其范围内包括很容易培养的微生物,以及仅在培养中难以繁殖的环境下繁殖的那些微生物。

[0036] 术语“滤器”在上下文中为拒绝大于一定大小的颗粒通过的装置。然而,该术语还可以包括拒绝对结合配偶体(如受体、抗体或其片段)具有明显结合特异性的物料通过的装置。因此,该术语还包括通常不视为“滤器”的装置,例如离心机和超速离心机中的膜、用特异性的结合配偶体如抗体或其他特异性结合物质浸渍的膜。本发明关注的专门的“滤器”因此还包括用于亲和层析的柱-本发明“滤器”的重要特征为其可保留目的污染物并且允许底物和特异于污染物的酶之间随后原位反应,使得能很容易进行随后源自底物的可检测部分的测量,参见下文。

[0037] 术语“底物”指其化学结构经历酶催化的转化的化学试剂。

[0038] 术语“可检测的部分”表示作为底物酶催化转化结果的化学个体,其中该化学个体包括可检测的而在底物中为不可检测的物理或化学特性。实例为荧光部分、发光部分和高特异性结合至结合配偶体的部分。

[0039] 术语“信号”是用来表示当可检测的部分记录于合适的测量系统中时其可测量的特征。

[0040] 本发明方法优选的实施方案

[0041] 污染物通常选自细菌、真菌如丝状真菌和酵母、藻类、原生动物、来自细菌的孢子、真菌孢子和花粉以及其碎片。不必要指出的是并非所有的这些污染物都是致病的,而是其在一些环境中的存在为非常不合乎需要的或甚至是有害的。工业发酵中污染微生物的存在为这许多当中的一个实例,其中污染物存在的经济和现实影响极大,而且在食品生产和应该把其价值归功于美学特征的产品的生产中,污染物可以是经济损失的原因。

[0042] 微生物和孢子的碎片已证实是严重的气管疾病如哮喘的触发剂-即使所述碎片(其通常由死的细菌或真菌组成,其或多或少是破碎的)不是活的,其仍然可以是在保证其检测和除去的程度上病理学相关的。

[0043] 本发明的方法可应用于来自各种来源的样品,唯一的规则为其必须能将包含污染物的样品并入介质中,其性质允许其可通过滤器。

[0044] 通常,该介质为液体介质。非限制性的实例包括环境水、饮用水、热水、工业用水、工艺用水、“适当位置的清洗”用水、制药用水、固体材料的液体提取物、悬浮或溶解的表面样品以及液体工业产品如化妆品、药物和食品。

[0045] 一些液体介质为来自目的环境或系统的直接的、未处理的样品形式。需要处理其他的样品以便产生进入本发明方法步骤的液体介质。

[0046] 有时,例如对所述介质进行预过滤以便筛选出可能干扰随后的检测的大尺寸的物料是合乎需要的。这样的预过滤器应当具有允许污染物通过但不允许大尺寸的物料如无关的固体颗粒通过的孔径大小。在一些实施方案中,这种两个步骤的过滤可与本发明方法的步骤b和c对预过滤器和其中预过滤的样品已经通过的滤器(初级滤器)的应用相结合。这样,增加两种测量以获得对总污染的测量是可能的。

[0047] 然而,对于一些类型的样品,本发明的方法不需要补充任何这样的初始步骤。通

常,这样的情况为所述的样品不包含任何大量的物料,其具有比得上或大于样品中目的污染物的大小;例如,许多水或空气样品在其源于其中高纯度(并且因此低的污染程度)为一般规则的系统时不需要任何预过滤。

[0048] 表面样品可通过用取样装置 / 器械擦拭预定的表面区域而获得,其包括吸收或吸附表面。取样装置随后置于包含流体的合适容器中并且搅拌以诱导表面污染物释放进入液体并且随后得到的液体介质用本发明的方法处理。

[0049] 可提取固体的样品可从环境样品如土壤、沉积物、植物、衣服(例如无菌服)、毛皮和羽毛等等获得。来自所述环境样品的污染物利用抽提液体提取并且抽提液体随后用本发明的方法处理。

[0050] 样品可以为食品,例如热加工的食品、食品组分、饲料产品和饲料组分。此外在此,污染物的提取是通过在液体中搅拌以诱导污染物释放进入抽提液体而允许随后本发明的方法用于该液体。

[0051] 在进行步骤 a 之前降低液体介质的粘度可能也是必要的。这样的情况是当样品实际上为液体但具有很不容易通过本发明所用滤器的高粘度时。粘度可用许多方法降低:通过稀释的方法或通过用化学试剂如溶解度增强剂或去污剂处理的方法。

[0052] 气体介质也可用本发明的方法处理。通过利用本发明的这个实施方案,例如提供了空气和其他气体污染测量的常规方法的替代方法 - 例如,在目前所用的许多方法提供空气中真菌孢子的常规测量(作为对过敏性人群的服务),其中对孢子计数的情况下,本发明提供了在更小的限定的环境中无需专门的设备而获得相同类型信息的简单、快速和方便的方法 - 参照,例如实施例 6,其中显示孢子计数可通过本发明的方法测定。

[0053] 所以,气体介质可以为空气,如来自无菌设备、层状气流装置的空气或环境空气,而且用于无菌装置或用于直接应用于住院患者的气体也可以用本发明的方法处理。

[0054] 为了从气体获得样品,可应用几种方法。一种为在取样阶段通过迫使气体介质通过滤器而在步骤 a 中简单地利用无菌滤器,并且随后应用后续步骤 b 和 c- 在这种情况下滤器的性质应当适于从气体获得样品并且技术人员将毫无问题能够选择合适的滤器;一种用于获得气体和空气样品的广泛使用的装置为“空气 - 氧 - 室”盒并且其用途也在本发明的上下文中考虑。或者,使气体通过促进微生物在液体中累积并且随后用本发明的方法处理该液体的液体捕集器。在这种情况下,样品为气体的,但介质实际上为液体。

[0055] 滤器通常具有足够小以保留介质中基本上所有污染物的孔径大小。也就是所有的目的污染物。本发明的实施方案中,当目的仅为制备样品以允许某些污染物(例如不是上述细菌、真菌或孢子的碎片)的检测时,孔可设为允许所述污染物通过滤器的大小。然而,因为例如原生动物细胞和某些细菌之间有大的差异,滤器的孔径大小可以变化。此外,为了“捕捉”具有确定大小的污染物,本发明的方法可以几个平行的途径进行,每个途径在步骤 a 中利用其自身的孔径大小;例如,两个获自不同孔径大小的测量结果的简单减法将提供具有该两个孔径大小其间大小的污染物存在的信息。

[0056] 因此,优选孔径大小至多 20 μm,如至多 15、至多 10、至多 5 以及至多 3 μm。为了保留微生物的孢子或碎片,优选甚至更小的孔径大小。

[0057] 另外,在许多实施方案中,孔径大小应该足够大以允许可检测部分通过滤器;这在随后的检测在液体介质上进行时是极其重要的,该液体介质已通过迫使其通过和离开滤器

而排空。在这里,孔径大小为至少 $0.1 \mu\text{m}$ (但可能更于如至少 $0.22 \mu\text{m}$ 或至少 $0.45 \mu\text{m}$) ,但此外,合适的孔径大小取决于可检测部分的选择。

[0058] 本发明所用的至少一种底物可通过被酶裂解 (或经化学转化) 而方便地产生可检测部分,其为污染物的特性。该意思指所述的酶在为所测定目标的污染物中是生化活性的。必须记住本发明允许总污染的检测以及具有某些亚类或种类的污染物的污染的检测。第一种情况中,利用由种系发生上保守的酶转化的底物将是方便的,所述的酶为在实际上所有生物来源的污染物中,即在大多数活的或能生存的微生物中以高度同源形式存在的酶或酶活性。在后者的情况下,利用由高度特异于相关污染物的酶转化的底物将是方便的。无论如何,酶通常选自糖酶、蛋白酶、脂肪酶、酯酶、酰胺酶、硫酸酯酶、核酸酶以及磷酸酶如碱性磷酸酶。

[0059] 在优选的实施方案中,加工底物的酶通过微生物组成型表达。此具有这样的优点,即污染物中酶产生的诱导应该不是必要的 - 另外要相关指出的是由于控制该诱导可能难以实现,酶活性的诱导可能是错误和不确定性的根源。

[0060] 因此,可用于本方法的酶包括在微生物 / 细菌细胞中天然产生的酶,并且根据本发明,可检测的酶活性优选为组成型表达的活性,即,在微生物靶群体 / 细菌的所有生长期表达的和 / 或与微生物靶群体 / 细菌的生理状态无关表达的。酶活性可以是胞内的和 / 或胞外的。该方法因此可包括选自水解底物而提供靶微生物群体 / 细菌生长的必需营养元素的酶的酶活性检测和定量。在本文中措辞“必需营养元素”表明在例如 Brock 等, *Biology of Microorganisms*, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, USA 中定义的营养素;因此必需营养元素包括营养素,在没有它们时细胞无法生长并且包括大量营养素以及微量营养素。因此本方法可以基于参与例如糖类、蛋白质、磷酸和硫酸代谢的微生物 / 细菌酶的检测。尤其,令人感兴趣的是检测参与包括磷酸酯,包括伯醇和仲醇、糖醇、环醇、苯酚和胺的酯的水解,释放无机磷酸根的磷酸代谢的碱性磷酸酶。该酶也水解多磷酸酯 PP_i 以及 PO_4^{3-} 基团从 PP_i (以及从许多核苷二和三磷酸和从甘露糖-6-磷酸) 转移至葡萄糖,形成葡萄糖-6-磷酸。如将在实施例中呈现的,根据本发明的碱性磷酸酶活性测量提供了实用的微生物数量测量。

[0061] 优选的底物为产生作为可检测部分的蓝色、绿色和红色产物 (荧光或发光等等) 的荧光生成或显色底物。光发射的检测为获得相关部分存在信息的非常方便和快速的方法。在此有用的底物在 Molecular Probes :Handbook of fluorescent probes and research products, 第九版, 作者 :Richard P. Haugland, 第 10 章, 第 397-448 页中公开。

[0062] 尤其优选利用选自 5-溴代-4-氯代-3-吲哚基磷酸二钠盐;9h-(1,3-二氯-9,9-二甲基吖啶-2-酮-7-基)磷酸铵盐;荧光素二磷酸四胺盐;甲基伞形基衍生物如 6,8-二氟-4-甲基伞形基磷酸,4-甲基伞形基磷酸二锂盐,4-甲基伞形基- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷和三氟甲基伞形基磷酸;4-硝基苯基磷酸;和 9-羟基-3-异吩噁唑酮磷酸。

[0063] 无论如何,不考虑所选择的底物,可检测部分应当优选在最多 100 皮摩尔的量,优选最多 50 皮摩尔,更优选最多 20 皮摩尔以及更优选最多 10 皮摩尔和最优选最多 1 皮摩尔时为可检测的。对于特定的可选择部分检测极限越低,本发明方法的灵敏度就越高。

[0064] 根据本发明,有可能利用一种单一底物,但也可能利用至少两种底物,其产生提供

信号的可检测部分,该信号可结合成一种单一测量的信号值。此意思是指获自这些部分的信号可在相同的测量窗内测量并且因此并入一种单一测量中(简单的实例为所述部分是相同的,即使其源于不同底物用不同酶的转化)。因此,这是获得样品中总污染信息的实用方法,尤其在利用一种单一底物获得该信息不可行的情况下。

[0065] 利用产生可检测部分而提供可辨识的信号的至少两种底物也是可能的。此提供了可单独测定几个不同组污染物的优点。

[0066] 本方法一个非常吸引人的特征为其允许活的微生物更好的测定。在许多现有技术方法中,包括培养的步骤具有可能不允许某些微生物生长以及实际上甚至可能杀死某些微生物的缺点 - 其可能只是无法找到能够培养所有微生物达到可检测水平的生长条件,并且因此培养前后微生物的相对分布不相同。因此现有技术的测量没有提供样品中所有相关微生物的精确测定,而只是能测定在给定的环境设置下可培养的那些微生物。本发明并无该缺点,因为富集步骤并不偏向或不偏向任何污染物并且因为随后底物与样品介质的反应步骤对介质中的任何微生物没有负面影响。因此,优选污染物为活的微生物,或换言之,优选来自对已经历步骤 c 的样品测量的最终结果为反映活的微生物含量的测量结果。

[0067] 为了获得活的微生物可靠的测量,因此应当选择上述底物以便利用通过活的微生物所特有的酶转化的那些底物 - 一个实例为在代谢活性的微生物中具有高周转率的组成型表达的酶。

[0068] 在本发明的实践中,需要的是液体载体中底物量不限制可检测部分的产量,因为结论是仅仅转化酶的量(并且由此污染物的量)将确定产量。通常,将选择底物 / 酶组合以便确保可检测部分的产量为已知体积的介质中污染物数量的函数(优选线性的)。

[0069] 在许多情况下确保所产生的可检测部分的量能够转变为“污染物数量”相对简单。例如其足以提供定性的结果(“污染”或“无污染”类型的结果),因为关注的仅仅为测定是否已经超出某个阈值。在其它情况下,对样品类型和样品所源自的系统的认识将确保本发明方法的一个单程提供污染计数的精确测定 - 其仅仅是确保步骤 b 中底物的剩余以使酶达到饱和的问题。

[0070] 然而,平行地进行该方法可能是必要的,以便在步骤 a 中使几种不同体积的介质通过滤器,而确保至少一种体积包含合适数量的污染物。替代方案为在步骤 a 中取几个具有相同体积的介质的样品,并且此后在步骤 b 中添加不同量的底物。

[0071] 步骤 c 中提及的一段时间为允许足够量的可检测部分形成以使其检测成为可能的时间间隔。该时间间隔适宜少于 24 小时,但通常更短,如至多 12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2 和 1 小时。通常该时间间隔将不少于 5 分钟并且大多数情况下不少于 20 分钟。

[0072] 在本发明优选的实施方案中,滤器为封闭、无菌过滤装置的一部分。过滤装置的无菌确保其不会影响随后测量中的信噪比,因为其并不对污染物本身起作用。该装置的封闭性质适合相同的目的,而且使得本发明方法更容易使用,因为该过滤装置有利于样品的简单、实用和无菌的处理。

[0073] 优选的装置为一次性封闭的无菌过滤装置,尤其为将滤器和过滤器套整合为一个不可逆封闭的结构单元的那些装置;所述过滤装置在不损坏过滤器套下无法打开 - 其为市场上可买到的如此处实施例中所用的那些。因为其小型(通常封闭的无菌过滤装置最长的截面轴不超过 10cm 长度,但存在更小的过滤装置,其长度不超过 9 或 8 或 7 或 6 或甚至

5cm)，其非常适于现场的样品制备。无菌过滤装置可选自商业上可获得的封闭 / 密封过滤单元用于液体的过滤。膜材料可选自任何可得到的膜材料，包括低蛋白结合Durapore®(PVDF)、尼龙膜、低蛋白结合亲水的LCR(PTFE)膜、乙酸纤维素等等。本发明方法目前优选的实施方案为Express® PES 膜的使用。

[0074] 有可能利用配备有窗的滤器，其例如允许对过滤器套内部的液体载体直接进行荧光测量 - 本发明的该实施方案尤其优选在这样的装置中，其中目的为连续监测底物转化以释放可检测的部分，参见下文。

[0075] 在本发明的许多实施方案中步骤 c 中的相互作用通过中断底物和污染物之间的接触而终止。该中断可通过从过滤装置排空液体载体而保留污染物在该过滤装置中而达到。简单地从该滤器倾泻或吸取液体至无污染物的容器中为达到该结果的一种方式，但优选的为在滤器的流入至流出侧的方向从过滤装置排空液体载体，通常通过对滤器的流入侧增加压力或者通过对滤器的流出侧降低压力而进行。增加压力可通过压缩空气或已知体积的液体（例如合适的缓冲液或其他的溶剂如水）从流入侧通过该滤器而达到。

[0076] 用其它方式终止步骤 c 中的相互作用也是可能的：可以例如通过物理或化学灭活底物或酶而在该滤器上终止该相互作用。

[0077] 最后，根据本发明，不完全终止该相互作用也是可能的（相应的在定期或连续监视底物的转化的系统中）。

[0078] 检测阶段

[0079] 本发明还包括步骤 c 后另外的步骤 d)，其需要定量或定性检测液体载体中的可检测部分以及将该部分的检测与样品中污染物的量或存在相关联。

[0080] 所述检测可以本领域技术人员通常所知的多种常规方法进行。

[0081] 除了基于与例如活的微生物靶群体 / 细菌数量相关的微生物 / 细菌酶活性检测，本程序包括任何其他的测定程序，其允许与污染物数量相关的酶的检测。这样的程序包括作为实例的免疫检测微生物 / 细菌酶的量以及编码目的酶活性的DNA 和 / 或 RNA 序列的检测。这样的程序可以基于本领域熟知的方法并且包括例如抗体的利用，该抗体被可检测部分选择性标记以及选择性与 DNA 或 RNA 序列杂交的寡核苷酸探针的利用。

[0082] 该测定可以是免疫方法或通过任何其他合适的方法，其检测可检测部分和特异性结合配偶体间的相互作用（即：受体相互作用，抗体或抗体片段相互作用，淬火或增强反应，其中可检测部分通过某种相互作用淬火或增强标准信号，等等）。然而，优选步骤 d 中的检测通过测量可检测部分所特有的荧光进行。这是快速、可靠和易于使用的方法，其不需要该测量的操作人员具有任何特殊的技能。

[0083] 如上所述，步骤 d 中的荧光可在不中断液体载体和污染物间接触下直接对液体载体测量。通常，这将在连续或若干次监视底物的转化时进行以便可确定时间和可检测部分量的关系 - 如果该关系为线性的，给定时间点的给定荧光值可很容易地与荧光对污染物数量的标准曲线相关联。

[0084] 荧光的测量为本领域熟知的技术，并且需要用具有比来自激发的荧光团的荧光发射更短波长的电磁波（通常为紫外线或可见光）激发荧光团。激发和荧光波长对每种荧光团是特定的，并且技术人员将知道如何选择用于两者目的的合适的波长。

[0085] 通常优选步骤 d 中的关联包括表示在标准条件下（如反应时间、温度等等）污染

物量和可检测部分量之间关系的预测定标准曲线的利用。

[0086] 根据本发明，检测可在微量滴定系统中进行（在可检测部分通过其与另一种物质如抗体相互作用时尤其适合）。在该实施方案的特殊形式中，液体载体直接从滤器的流出侧流到微量滴定板中，这是可通过使滤器与微量滴定板一体化而达到的效果。

[0087] 信号的增强

[0088] 在步骤a之前或在步骤b中，使污染物受到信号增强的影响可能是有利的，此可提高随后检测中的总灵敏度或有助于随后特定类型污染物的检测或降低特定类型污染物的检测。

[0089] 这种信号增强的影响通常选自酶增强物质、选择性的温度或温度范围、选择性的pH、选择性的盐浓度、非选择性的生长增强剂和选择性的生长增强物质。本领域技术人员知道各种可利用的可能性并能选择与特定的样品、目的污染物、底物 / 酶组合和检测方法有关的这些。

[0090] 在步骤a之前通过介质的温育而增强信号也是可能的。该温育优选需要

[0091] - 用酶诱导物质处理，由此增强可检测部分的检测（并且因为促进底物的转化而因此获得通常的增强效果），和 / 或

[0092] - 使该介质经受用于酵母、真菌或细菌的选择性物质（此具有帮助某些污染物检测的作用），和 / 或

[0093] - 使该介质经受用于微生物的非选择性生长增强剂（因为污染物的总数因此增加 / 繁殖而也获得通常的增强效果 - 然而，该选择在所想要的结果必须反映样品中活的微生物的“真实的”数量时应当避免，参见以上的理由），和 / 或

[0094] - 使该介质经受能够提取细胞酶的物质（因为其也促进步骤b中底物的转化，可比得上第一种替代方法）。

[0095] 本发明的试剂盒

[0096] 本发明此外涉及用于介质中污染物测定的试剂盒，该试剂盒包含

[0097] - 至少一种无菌过滤装置，其包括具有足够小以保留污染物在滤器流入侧上的孔径大小的滤器，

[0098] - 用于使已知体积的介质通过该滤器（例如注射器）的装置，

[0099] - 与污染物相互作用时将释放可检测部分的试剂（例如以上教导的底物），该可检测部分的量与已和该试剂相互作用的污染物的量相关，和

[0100] - 陈述以下步骤的说明书，a) 获得已知体积的介质和使其通过无菌过滤装置，b) 使滤器的流入侧与该试剂接触，c) 允许该试剂与可能在滤器的流入侧上的污染物相互作用，和 d) 定量检测该可检测的部分。

[0101] 所有表征该特定试剂盒的特征都在上面进行了详细描述，这意味着涉及无菌过滤装置、产生可检测部分的试剂等等的上述公开对本发明的试剂盒已作必要的修正以及可用作其中的组分，并且意味着该说明书符合与此处和本发明方法的使用有关的教导，这些教导对本发明的试剂盒已作必要的修正。

[0102] 实施例的前言

[0103] 材料和方法

[0104] 使用的培养基

[0105] R2A 琼脂包含 (g/1) : 酵母提取物 0.5 ; 胰蛋白胨 0.5 ; 酪蛋白水解物 0.5 ; 葡萄糖 0.5 ; 可溶性淀粉 0.5 ; 丙酮酸钠 0.3 ; 磷酸氢二钾 0.3 ; 硫酸镁 0.05 ; 琼脂 12.0。

[0106] 酵母提取物琼脂 (g/1) : 胰蛋白胨 (来自酪蛋白, 胰腺的蛋白胨) 6.0 ; 脱水的酵母提取物 3.0 ; 琼脂 15.0。

[0107] 可饮用水 / 热水培养基 (g/1) : 0.125 酵母提取物。

[0108] 稀释培养基 (g/1) ; 氯化钠 8.5 ; 蛋白胨 (来自酪蛋白, 胰腺) 1.0。

[0109] 除非另有说明所有化学试剂获自 Merck KGaA, Darmstadt, Germany。

[0110] 可培养细菌的计数

[0111] 饮用水中可培养微生物的计数, 即异养平板计数 (HPC), 根据欧洲标准 DS/EN ISO 6222 进行。将样品转入酸洗 / 高压灭菌的蓝色盖瓶子并且在分析前在 5 °C 储存。所有样品在取样 4-5 小时内分析。将一定量的未加工的检验样品或蛋白胨稀释的检验样品置于陪替氏培养皿中。随后添加 15-20ml 熔化酵母提取物培养基并且通过温和的旋转小心混合。随后允许培养基凝固。倒置平板并且在 22±2 °C 温育 68±4h 以及在 36±2°C 温育 44±4h。结果表示为每毫升水样菌落形成单位的数目 (cfu/ml)。

[0112] 可饮用热水中可培养微生物的计数由根据标准操作程序 (丹麦标准 DSF5984) 的商品化实验室 (Eurofins, Denmark) 实施。结果以在四种温育温度 (37、44、55 和 65°C) 的 cfu/ml 水样报告。与所估计的 cfu/ml 的最高数目一起温育用于数据分析。

[0113] 细菌利用吖啶橙染色的直接计数 (AODC)

[0114] 利用吖啶橙直接计数 (AODC) 获得细菌总计数。等分试样在黑色 Nuclepore 聚碳酸酯 0.2- μ m 孔径 - 大小的滤器上在最大 150mm Hg 时过滤。滤器随后用两次 8ml 体积的缓冲液 (柠檬酸盐 - 磷酸盐, pH5.2) 洗涤。接着滤器用吖啶橙 (终浓度 0.02%) 染色 3 分钟, 随后用 3ml 灭菌 Milli-Q 水洗涤两次并且固定于显微镜的载玻片上。滤器利用表荧光显微镜法分析。对于每一载玻片观察至少 10 个显微镜视野并且每一滤器计数至少 400 个细胞。细菌数目以每毫升试样的细菌细胞数计算。

[0115] 利用 4- 甲基伞形基标记的酶模式底物测定液体试样中的酶活性

[0116] 使液体试样滤过 0.22 μ m 急速 33mm 无菌 Millex 注射器推进的过滤装置 (Millipore Corporation, Bedford, MA U. S. A)。利用可重复使用的塑料注射器, 该过滤装置接着用含有酶底物的合适的缓冲液饱和。将该滤器温育一段固定的时间。温育混合物随后利用 2ml pH10.6 的甘氨酸 -NaOH 缓冲液洗出或通过利用可重复使用的塑料注射器施加气压而直接从该过滤装置获得。用移液管收集等分试样并且分别转入 10x10mm 的塑料荧光比色杯 (Sarstedt, Germany) 或 100 微升的比色杯 (Turner Biosystems, USA)。在定制的 MycoMeter 荧光计 (Turner Biosystems, USA) 上在 365nm 激发波长和 465nm 发射波长处测量荧光输出量。酶活性以通过 4- 甲基伞形基衍生物的酶促裂解后释放的荧光团 4- 甲基伞形酮产生的荧光报告。活性以荧光单位 / 时间单位 / ml 报告。

[0117] 实施例 1

[0118] 饮用水稀释系列中 AP 酶活性和细菌数目之间的线性度

[0119] 从 MycoMeter laboratorium 的水龙头取样饮用水并且加入酵母提取物至 125mg/1 终浓度。样品随后在室温温育。通过分光光度计上 OD620 的测量监测细菌生长。当细菌生长到达对数后期 (OD = 0.04) 时取样饮用水用于异养平板计数 (HPC) 测定。饮用水的等

分试样用过滤的高压灭菌饮用水稀释 100、250、500、750 和 1000 倍。随后根据上述材料和方法章节中所述的标准方法对每一稀释物一式三份测定碱性磷酸酶 (AP 酶) 活性。

[0120] 温育的水样中六次 HPC 的重复测定平均为 77×10^5 cfu/ml。该 HPC 结果用于计算温育的水样每一稀释物的 cfu/ml。图 1 表明根据饮用水稀释物计算的 AP 酶活性和 HPC 之间的线性度。来自实验 1 的数据用于计算饮用水样品中最小量的可检测细菌数。根据所述用于本发明的标准方法和根据实验 1 中数据计算的, 可检测细菌的最小数为 21cfu/ml 饮用水样品。

[0121] 通过简单地增加或减少样品和酶底物之间的接触时间和 / 或通过增加或减少过滤的水量, 可根据需求或需要提高或降低检测极限。举例来说, 1 个细菌 /ml 饮用水样品可通过过滤 1 升饮用水样品并且温育 2.6 小时而检测。结果证明了 AP 酶活性测定的高灵敏度和可再现性以及 AP 酶活性 ($r = 0.99, p < 0.001$) 和大范围的所计算的细菌浓度之间强的线性关系。该数据也证明了该方法的灵敏度可仅仅通过增加样品体积而提高。

[0122] 实施例 2

[0123] 添加微量酵母提取物的饮用水样品中 AP 酶活性随着温育时间的线性提高

[0124] 从 MycoMeter laboratorium 的水龙头取样饮用水并且加入酵母提取物至 125mg/1 终浓度。样品随后在室温温育。通过分光光度计上 OD620 的测量监测细菌生长。当细菌生长到达对数后期 ($OD = 0.04$) 时取样饮用水用于根据材料和方法章节中所述的标准方法测定 AP 酶活性。饮用水样品用过滤的和高压灭菌的饮用水稀释 100 倍。随后在 15、30、45 和 60 分钟不同的温育时间一式三份测定 AP 酶活性。图 2 显示 AP 酶活性对温育时间的散布图。结果证明了温育时间和 AP 酶活性之间的线性关系。该结果也证明了该方法的灵敏度可仅通过增加样品与底物分子的接触时间而提高。

[0125] 实施例 3

[0126] 可饮用热水中 AP 酶活性和所估算的可培养细菌的菌落形成单位之间的相关性

[0127] 水样获自一年时间内医院的六个出水口。在 2-4 小时内分析水样中的 AP 酶活性。HPC 计数由商业实验室根据材料和方法章节中所述的丹麦标准 DSF 5984 进行。图 3 显示了 AP 酶活性和 HPC 的散布图。结果证明了可饮用热水中 AP 酶活性和 HPC 之间的正线性相关 ($r = 0.93, p < 0.001$)。

[0128] 实施例 4

[0129] 饮用水中 AP 酶活性和所估算的可培养细菌菌落形成单位之间的相关性

[0130] 样品获自一系列饮用水系统, 包括私人家庭、商业和公共建筑。分析在取样 2-12 小时内进行。饮用水试样保存在 5°C 直到分析。可培养细菌的计数和 AP 酶活性的测定根据以上材料和方法章节中所述的标准方法进行。图 4 显示饮用水样品中 AP 酶活性和 HPC 的散布图。结果证明了 AP 酶活性和 HPC 之间的正线性相关 ($r = 0.85, p < 0.001$)。

[0131] 实施例 5

[0132] 可饮用热水中 AP 酶活性和吖啶橙直接计数 (AODC) 之间的相关性

[0133] 样品获自一系列饮用水系统, 包括私人家庭、商业和公共建筑。分析在取样 24 小时内进行。AODC 如材料和方法章节中所述进行。图 5 显示了可饮用热水中 AP 酶活性和 AODC 的散布图。结果证明了 AP 酶活性和 AODC 之间的强正线性相关 ($r = 0.78, p < 0.001$)。

[0134] 实施例 6

[0135] N-乙酰氨基己糖苷酶活性和真菌孢子生物量之间的线性度

[0136] 真菌孢子悬浮液从具有真菌普通青霉的琼脂培养物（麦芽提取物琼脂）制备。

[0137] 悬浮液的孢子生物量通过使 6ml 孢子悬浮液滤过预称重的尼龙膜滤器 (0.45 μ m) 并且在 60°C 干燥 24 小时测定。孢子悬浮液稀释物系列通过分别转移 50 μ l、100 μ l、250 μ l 和 50 μ l 孢子悬浮液至各个培养管中制备一式两份。孢子悬浮液通过添加高压灭菌蒸馏水至每一培养管而稀释至总共 3ml。

[0138] 孢子悬浮液的 N-乙酰氨基己糖苷酶的酶活性如材料和方法章节中所述进行分析，其中有下列改进：过滤装置用含有酶底物 4-甲基伞形基- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷的合适的缓冲液饱和。温育后，温育混合物通过利用可重复使用的塑料注射器加压而直接从过滤装置获得。100 μ l 试样随后通过转入含有 2ml pH 10.6 的合适缓冲液的塑料比色杯而碱化。

[0139] 孢子生物量和 N-乙酰氨基己糖苷酶活性之间的强正线性相关 ($r = 0.9975$; $p < 0.001$) 在散布图图 6 中显示。

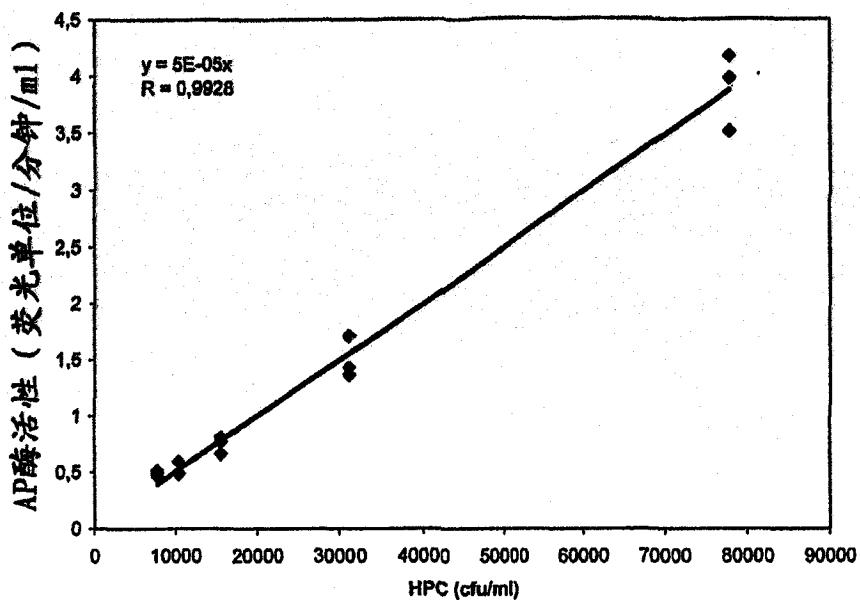


图 1

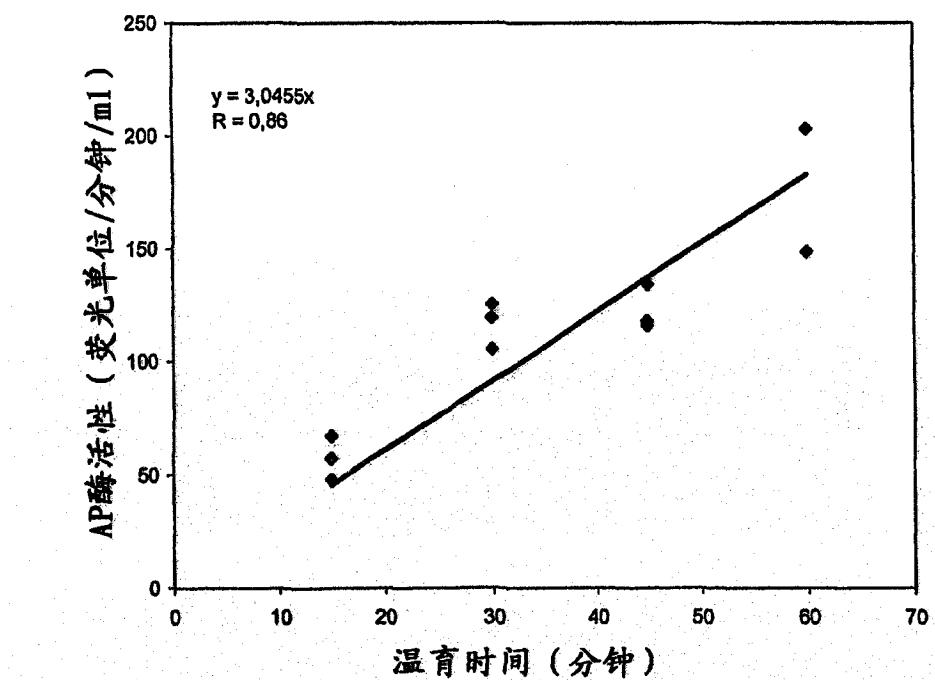
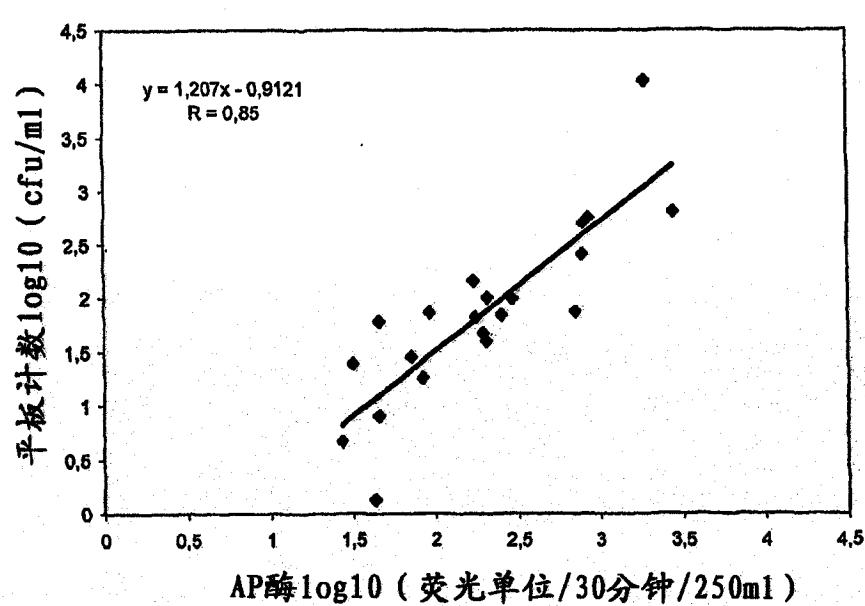
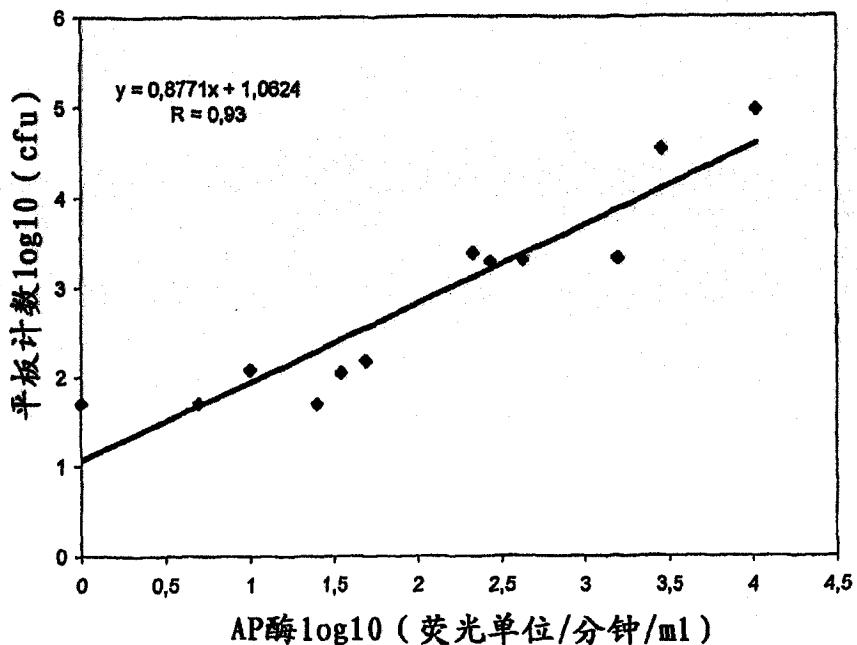


图 2



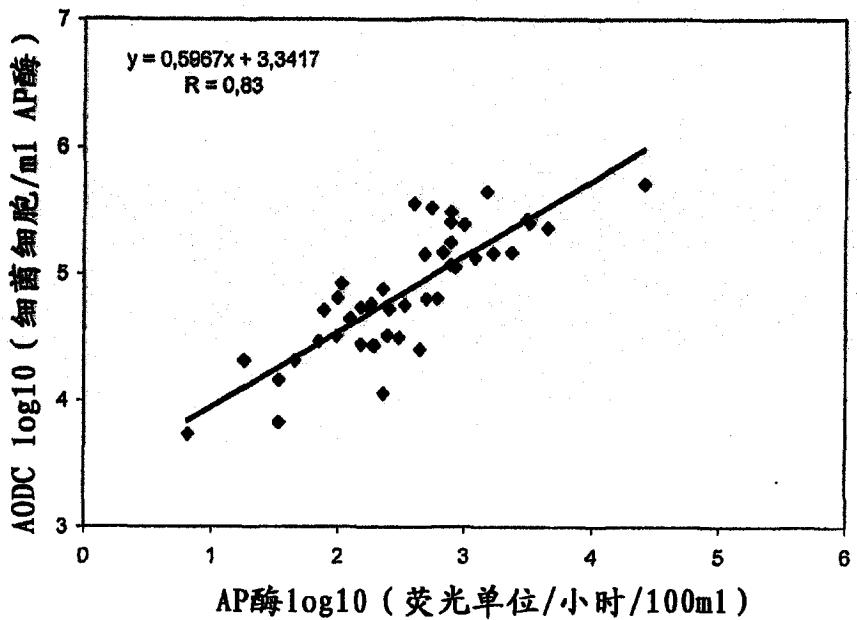


图 5

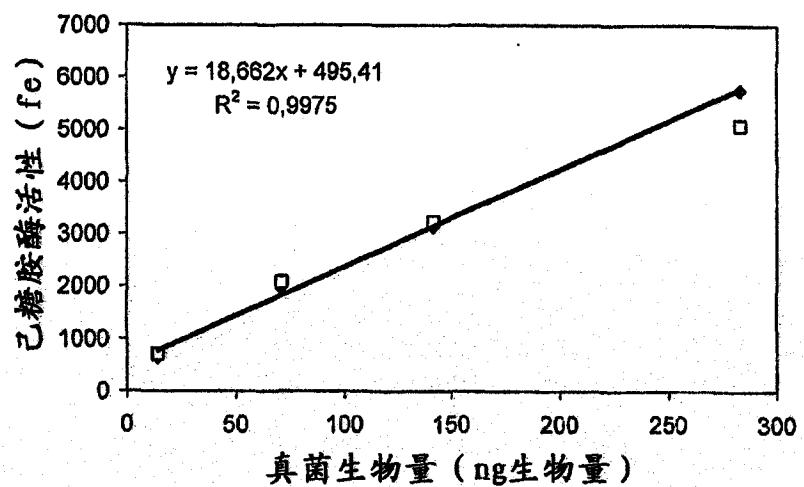


图 6