



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107532121 A

(43)申请公布日 2018.01.02

(21)申请号 201680024743.X

(22)申请日 2016.04.26

(30)优先权数据

62/154,299 2015.04.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.10.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/029306 2016.04.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/176176 EN 2016.11.03

(71)申请人 3M创新有限公司

地址 美国明尼苏达州

(72)发明人 贾森·W·比约克

埃文·D·布鲁蒂内尔

亚当·J·斯塔内纳斯

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 吴润芝 郭国清

(51)Int.Cl.

C12M 1/00(2006.01)

C12M 1/34(2006.01)

C12Q 1/06(2006.01)

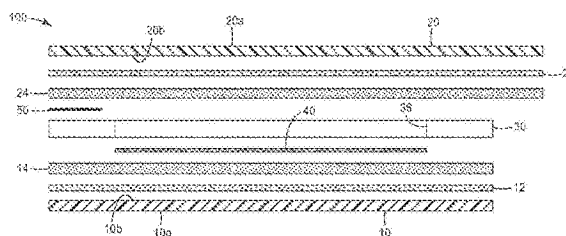
权利要求书2页 说明书28页 附图3页

(54)发明名称

用于厌氧微生物的培养装置

(57)摘要

本公开提供了一种用于对微生物的菌落进行计数的培养装置。所述装置可包括基部、盖片和设置在两者之间的无孔间隔构件。所述间隔构件包括限定生长隔室的开口。至少一个粘合剂层在所述生长隔室中附着到所述基部或所述盖片。冷水可溶胶凝剂和干燥的除氧试剂附着到所述至少一个粘合剂层。所述除氧试剂基本上由直径小于106微米的颗粒组成。



1. 一种用于对微生物菌落进行计数的培养装置,所述装置包括:
基部,所述基部具有相对的内表面和外表面;
盖片,所述盖片具有相对的内表面和外表面;
间隔构件,所述间隔构件设置在所述基部和所述盖片之间,其中所述间隔构件联接至所述基部或所述盖片,其中所述间隔构件包括限定生长隔室的形状和深度的开口,其中所述间隔构件和所述生长隔室布置在所述基部的所述内表面和所述盖片的所述内表面之间;
在所述生长隔室中附着到所述基部的第一粘合剂层或在所述生长隔室中附着到所述盖片的第二粘合剂层;
附着到所述第一粘合剂层或所述第二粘合剂层的有效量的干燥的除氧试剂;和
附着到所述第一粘合剂层或所述第二粘合剂层的干燥的冷水可溶胶凝剂;
其中所述盖片联接至所述基部或联接至所述间隔构件。
2. 根据权利要求1所述的培养装置,其中所述除氧试剂基本上由直径小于106微米的颗粒组成。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的培养装置,其还包括在所述生长隔室中附着到所述第一粘合剂层或所述第二粘合剂层的有效量的干燥的二氧化碳生成试剂。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的培养装置,其中所述间隔构件是无孔的。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的培养装置,其还包括干燥的营养物质以有利于目标微生物的生长,其中所述营养物质在所述生长隔室中附着到所述基部或所述盖片。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的培养装置,其还包括用于检测目标厌氧微生物的生长的第一指示试剂,其中所述第一指示试剂在所述生长隔室中附着到所述基部或所述盖片。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的培养装置,其还包括有效量的选择剂以抑制非目标微生物的生长,其中所述选择剂在所述生长隔室中附着到所述基部或所述盖片。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的培养装置,其还包括有效量的还原剂,其中所述还原剂在所述生长隔室中附着到所述基部或所述盖片。
9. 根据权利要求3至8中任一项所述的培养装置,其中所述二氧化碳生成试剂包括金属碳酸盐。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的培养装置:
其中所述基部的所述内表面具有附着到其上的所述第一粘合剂;
其中布置在所述生长隔室中的一种或多种第一组分附着到所述第一粘合剂;
其中所述第一组分选自所述胶凝剂、所述除氧试剂、所述缓冲试剂、所述营养物质、所述指示试剂、所述选择剂、所述还原剂、以及前述第一组分中的任何两个或更多个的组合组成的组。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的培养装置:
其中所述盖片的所述内表面具有附着到其上的所述第二粘合剂;
其中布置在所述生长隔室中的一种或多种第三组分附着到所述第二粘合剂;
其中所述第三组分选自所述胶凝剂、所述除氧试剂、所述缓冲试剂、所述营养物质、所述指示试剂、所述选择剂、所述还原剂、以及前述第三组分中的任何两个或更多个的组合组成的组。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的培养装置, 其还包括被布置与所述生长隔室流体连通的第二指示试剂, 其中所述第二指示试剂指示非目标微生物和目标微生物的存在。

13. 一种检测样品中的微生物的方法, 所述方法包括:

将根据前述权利要求中任一项所述的培养装置放置于开放构型中, 其中所述开放构型提供通向所述生长隔室的通道;

将预定体积的含水液体放入所述生长隔室中;

将样品放入所述生长隔室中;

闭合所述培养装置;

其中将所述含水液体和所述样品放入所述生长隔室中并且闭合所述培养装置包括形成由所述培养装置的所述基部、所述盖片和所述间隔件包封的半固体微生物培养基;

将所述培养装置温育足以允许在所述培养基中形成微生物菌落的时间段; 以及检测所述微生物菌落。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中闭合所述培养装置包括留下从所述培养装置外部的环境至包封在所述生长隔室中的半固体微生物培养基的开放的流体通路。

15. 根据权利要求13或权利要求14所述的方法, 其中将所述样品放入所述生长隔室中包括将添加剂放入所述生长隔室中, 其中所述添加剂包括有效量的选择剂或指示剂, 用于检测微生物生长。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其中所述添加剂包括选择剂, 其中所述有效量的所述选择剂基本上允许所述培养装置中乳酸菌的生长, 并且所述有效量的选择剂基本上抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、产孢梭菌、产气荚膜梭菌、脆弱拟杆菌、产黑色素普雷沃氏菌和/或梭杆菌属物种的生长。

17. 根据权利要求13至16中任一项所述的方法, 其中将所述培养装置温育一定时间段包括将所述培养装置在有氧气氛中温育所述时间段。

18. 根据权利要求13至17中任一项所述的方法, 其中在将所述培养装置温育之后, 检测所述微生物菌落还包括对所述培养装置中的一个或多个可目测检测的菌落进行计数。

19. 根据权利要求13至18中任一项所述的方法, 其中检测所述微生物菌落包括目测检测所述生长隔室中所述菌落附近的气泡。

20. 根据权利要求15至19中任一项所述的方法, 其中对一个或多个微生物菌落计数还包括将产生二氧化碳的菌落与不产生二氧化碳的菌落区分开。

用于厌氧微生物的培养装置

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2015年4月29日提交的美国临时专利申请62/154,299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。

背景技术

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

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

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

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

[0007] 然而,这些装置和其他装置可能造价高昂,也许不适合用后即丢弃。这些装置的组装和/或使用也可能繁琐不便。尽管本领域已尝试生产在厌氧环境中培养厌氧微生物的简易装置,但仍需要改良的厌氧培养装置。

发明内容

[0008] 本公开大体涉及检测样品中的微生物,任选地对样品中的微生物进行计数。具体地讲,本公开涉及微耐氧、微需氧、专性厌氧微生物的生长和检测。生长和检测可使用自主产生改良环境的培养装置进行。产生改良环境的装置使用水溶液激活,以产生具有减小的溶解氧浓度以及任选地增大的溶解二氧化碳浓度的含水生长培养基。

[0009] 本文公开的本发明的培养装置和方法甚至可以在含氧(例如,含正常的大气氧)环境中温育微生物的同时,支持微耐氧、微需氧或专性厌氧微生物的生长,还支持对这些微生物进行检测和区分。这有利于省去对培养厌氧微生物通常需要的专门温育设备和试剂(例如,厌氧菌罐、一次性厌氧菌袋、钯催化剂、厌氧手套箱)的需要。另外,本发明的方法允许检测各单独菌落产生的二氧化碳气体,由此支持对细菌进行区分,从而省去了分离纯培养物所需的额外温育时间、还避免了使用发酵管来检测气体产量。此外,本公开涉及对样品中的

微耐氧、微耐氧或专性厌氧微生物进行计数。微需氧和专性厌氧微生物具有共同的特征，即，它们需要在低氧环境中生长繁殖。

[0010] 在一个方面，本公开提供了一种用于对微生物的菌落进行计数的培养装置。装置可包括具有相对的内表面和外表面的基部、具有相对的内表面和外表面的盖片、设置在基部和盖片之间的间隔构件、有效量的干燥的除氧试剂，以及干燥的冷水可溶胶凝剂。盖片可联接至基部或间隔构件。间隔构件可联接至基部和/或盖片。间隔构件包括限定生长隔室的形状和深度的开口。生长隔室布置在基部的内表面和盖片的内表面之间。第一粘合剂层可在生长隔室中附着到基部或第二粘合剂层可在生长隔室中附着到盖片。除氧试剂可附着到第一粘合剂层或第二粘合剂层。胶凝剂可在生长隔室中附着到基部或盖片。

[0011] 在任一上述实施方案中，除氧试剂可基本上由直径小于106微米的颗粒组成。在任一上述实施方案中，装置还包括在生长隔室中附着到第一粘合剂层或第二粘合剂层的有效量的干燥的二氧化碳生成试剂，其中二氧化碳生成试剂基本上由直径小于106微米的颗粒组成。在任一上述实施方案中，间隔构件可以是无孔的。在任一上述实施方案中，装置还可包括附着到第一粘合剂层或第二粘合剂层的干燥的缓冲试剂、干燥的营养物质、指示试剂、选择剂或还原剂。在任一上述实施方案中，二氧化碳生成试剂可包括金属碳酸盐。在任一上述实施方案中，除氧试剂可以约 $1.5\mu\text{mol}/10\text{cm}^2$ 至约 $15\mu\text{mol}/10\text{cm}^2$ 的量布置在生长隔室中。

[0012] 在另一方面，本公开提供了一种检测样品中的厌氧微生物的方法。所述方法可包括将根据上述实施方案中任一项所述的培养装置放置于开放构型中，其中该开放构型提供通向生长隔室的通道；将预定体积的含水液体放入生长隔室中；将样品放入生长隔室中；闭合培养装置；将培养装置温育足以允许在培养基中形成微生物菌落的时间段；以及检测微生物菌落。将含水液体和样品放入生长隔室中并且闭合培养装置可包括形成由培养装置的基部、盖片和间隔件包封在生长隔室中的半固体微生物培养基。

[0013] 在所述方法的任一上述实施方案中，闭合培养装置可包括留下从培养装置外部的气态环境至包封在生长隔室中的半固体微生物培养基的开放的流体通路。在所述方法的任一上述实施方案中，在温育培养装置之后，检测微生物菌落还可包括对培养装置中的一个或多个可目测检测的菌落计数。

[0014] 词语“优选的”和“优选地”指在某些情况下可提供某些有益效果的本发明实施方案。然而，在相同的情况或其它情况下，其它实施方案也可可是优选的。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，且并非旨在将其他实施方案排除在本发明范围之外。

[0015] 术语“包括/包含”及其变型形式在说明书和权利要求中出现这些术语的地方不具有限制的含义。

[0016] 如本文所用，“一个”、“一种”、“所述(该)”、“至少一个(种)”以及“一个(种)或多个(种)”可互换使用。因此，举例来说，一种营养物质可被理解为“一种或多种”营养物质。

[0017] 术语“和/或”意指所列要素的一个或全部，或者所列要素的任意两个或更多的组合。

[0018] 另外，在本文中，通过端点表述的数值范围包含该范围内所含的所有数值(例如，1至5包含1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等)。

[0019] 本发明的上述概述并非旨在描述本发明的每个所公开的实施方案或每种实施方

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

[0020] 下面将结合附图和描述介绍上述及其它实施方案的附加细节。通过说明书、附图和权利要求书,其它特征、目的和优点将变得显而易见。

附图说明

[0021] 图1为根据本公开的培养装置的一个实施方案的平面图。

[0022] 图2为沿着图1的培养装置的线2-2的侧面剖视图。

[0023] 图3为图1的培养装置的分解侧视图。

具体实施方式

[0024] 在详细解释本公开的任何实施方案之前,应当了解,本发明在其应用中不仅限于下文说明中所提及或下文附图中所示出的构造细节和部件布置方式。本发明能够具有其它实施方案,并且能够以各种方式实践或进行。另外,应当理解,本文使用的措词和术语是用于说明目的而不应被视为限制性的。本文使用的“包括”、“包含”或“具有”及其变型形式意在涵盖其后列出的项目及其等同形式以及附加项目。除非另外说明或限定,否则术语“连接”和“联接”及其变型以广义方式使用并且涵盖直接和间接连接和联接二者。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,术语诸如“前部”、“后部”、“顶部”、“底部”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、指示或暗示设备的必要或必需取向、或规定本文所述的本发明在使用时将如何使用、安装、显示或定位。

[0025] 如本文所用的术语“微生物(microorganism或microbe)”是指可以是单个细胞或多细胞生物体的任何微观生物体。该术语通常用于指能够在合适的培养基中生长和繁殖的任何原核或真核微观生物体,包括但不限于一种或多种细菌。本发明的范围涵盖的微生物包括原核生物,即细菌和古细菌;以及各种形式的真核生物,包括原生动物、真菌、酵母(例如,厌氧酵母)、藻类等。术语“目标微生物”是指期望检测的任何微生物。

[0026] 如本文所用,术语“厌氧微生物”或“厌氧菌”是指对氧敏感并且在氧的存在下将不会生长的微生物。厌氧微生物或厌氧菌是其生长不需要氧的任何生物体。厌氧微生物包括专性厌氧菌和兼性厌氧菌两者。专性厌氧菌是在暴露于大气水平的氧时将死亡的那些微生物。兼性厌氧菌是在氧存在的情况下能进行有氧呼吸,但是在氧不存在的情况下能够切换到发酵或无氧呼吸的生物体。本发明的方法和系统可用于专性厌氧菌和兼性厌氧菌两者的富集和检测。

[0027] 术语“微需氧微生物”或“微需氧细菌”在本文中用于指仅在微量的氧存在的条件下生长的任何微生物。微需氧菌使用氧气,但是仅以极低的浓度(低微摩尔范围),通常为5-15%的氧气浓度水平,正常氧气浓度或大于约15%的浓度抑制生长。

[0028] 如本文所用的术语微生物的“培养”或“生长”是指通过使微生物体在有利于其生长的条件下在预先确定的培养基中繁殖而使微生物体倍增的方法。更具体地,其为提供合

适的培养基和条件以有利于微生物的至少一个细胞分裂的方法。培养基为包含微生物生长所需的所有营养物质和必需的物理生长参数的固体、半固体或液体培养基。

[0029] 如本文所用的术语“富集”是指通过提供具有有利于特定微生物的生长的特定和已知属性的培养基和条件而选择性地使所述特定微生物的生长富集的培养方法。富集培养的环境将积极地影响所选微生物的生长,和/或消极地影响其它微生物的生长。

[0030] “除氧试剂”和“氧清除剂”将被广义地用于本文以表示可消耗、耗尽或与来自给定环境的氧反应的化合物。优选地,除氧试剂不减慢或抑制厌氧微生物的生长。

[0031] 术语“还原试剂”是指能够降低通过本公开装置的生长隔室中的干燥组分的水合而形成的半固体培养基的 E_h 势能的物质。

[0032] 本公开整体涉及用于使厌氧或微需氧细菌生长的制品和方法。具体地讲,本公开提供了一种用于培养厌氧或微需氧细菌的装置。所述装置包括减少分子氧的有效量的除氧试剂。有利地,本发明的装置是高度稳定的(例如,在环境温度下)并且避免了对专用设备和/或压缩气体的需要,以便实现和维持用于培养厌氧微生物的厌氧环境。此外,所述装置能够在装置水合后小于一个小时之内产生有利于厌氧或微需氧微生物的生长的液体环境。

[0033] 本发明整体涉及检测样品中的微生物,任选地对样品中的微生物进行计数。具体地讲,本公开涉及各种不同组的微需氧、微耐氧或专性厌氧微生物的生长和检测。各种不同组包括统称为乳酸菌(在下文为“LAB”)的亚组。LAB的特征在于能够将葡萄糖主要发酵成乳酸(“同型发酵”乳酸菌)或发酵成乳酸、二氧化碳和乙醇(“异型发酵”乳酸菌)。现在已知微需氧、微耐氧或专性厌氧微生物的生长和检测可使用自主产生低氧环境的培养装置进行。

[0034] 某些微生物被认为是兼性厌氧微生物。因此,它们可在存在或不存在氧气的情况下生长。这些微生物,以及专性厌氧微生物,可通过在低氧或厌氧环境中培养而相对于严格需氧微生物选择性地富集。本公开的装置有利地可用于选择性地使还包含严格需氧微生物的样品中存在的兼性厌氧和专性厌氧微生物富集。

[0035] 某些微生物厌氧生长。此外,其它微生物诸如LAB能够在氧气的存在下生长(即,它们是“耐氧的”)。尽管它们的发酵代谢用于产生某些食品(例如,酸奶、奶酪、泡菜),但是它们也被已知为例如加工的肉、啤酒和葡萄酒中的食物腐败剂。

[0036] 目前还已知,可制得干燥、可再水合的独立成套的产生还原氧环境的培养装置。培养装置包括布置在培养装置的生长区中的有效量的基本上干燥的除氧试剂并且能够在预先确定的体积的含水溶液中再水合,其中在再水合时,除氧试剂能够参与耗氧反应。此外,目前已知,耗氧反应可消耗足量的氧气,以有利于微耐氧微生物、微需氧微生物或专性厌氧微生物的生长。此外,培养装置可保持在有氧环境中,其中培养装置可维持至少约8天的低氧环境以便有利于前述微生物的生长。

[0037] 本文公开的干燥的、可再水合的培养装置提供优于现有技术的多个优点。例如,用于计数和鉴定厌氧微生物的大多数技术涉及在使用前高压消毒的液体培养基(例如,发酵液或琼脂)的使用。灭菌的高温倾向于将大部分氧气从液体培养基中排出。在灭菌之后,搅拌和/或暴露于空气可将氧气重新引入培养基中。相比之下,本公开的装置包含生成用于培养厌氧或微需氧微生物的期望厌氧环境的成分。

[0038] 可以分析可源自任何来源的试验样品中的所关注菌种,所述任何来源例如:生理流体(例如,血液、唾液、晶状体液、滑膜液、脑脊液、脓汁、汗液、渗出物、尿液、粘液)、黏膜组

织(例如,口腔黏膜、齿龈黏膜、鼻黏膜、眼黏膜、气管黏膜、支气管黏膜、胃肠黏膜、直肠黏膜、尿道黏膜、输尿管黏膜、阴道黏膜、子宫颈黏膜、子宫粘膜)、哺乳期乳汁、粪便等。另外,试验样品可源自身体部位,例如伤口、皮肤、前鼻孔、鼻咽腔、鼻腔、鼻前庭、头皮、指/趾甲、外耳、中耳、口、直肠、阴道、腋窝、会阴、肛门,或其他类似的部位。

[0039] 除了生理流体外,其他试验样品可包含其他液体以及溶解或悬浮于液体介质中的一种或多种固体。所关注的样品可包括工艺物料流、水、食品、食品成分、饮料、土壤、植株或其他植被、空气、表面(例如,制造工厂、医院、诊所或住宅中的墙壁、地板、设备、用具),等等。

[0040] 需要在氧张力降低的环境中生长的细菌(即,微需氧细菌)和/或耐受氧张力降低的环境且可在其中生长的细菌(即,耐氧细菌)的非限制性示例包括幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、弯曲菌属(*Campylobacter*)菌种(例如,空肠弯曲菌(*C. jejuni*)、大肠弯曲菌(*C. coli*)、胎儿弯曲菌(*C. fetus*))、中间链球菌(*Streptococcus intermedius*)、血链球菌(*Streptococcus sanguis*)、星座链球菌(*Streptococcus constellatus*)、麻疹孪生球菌(*Gemella morbillorum*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)菌种和酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)。

[0041] 可在本公开的装置和方法中检测和计数的LAB的属的非限制性示例包括属于乳杆菌目的属。这些属包括例如,乳杆菌属(*Lactobacillus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、片球菌属(*Pediococcus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)和链球菌属(*Streptococcus*)。可在本公开的装置和方法中检测和计数的LAB的其它属包括,例如,肉食杆菌属(*Carnobacterium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、酒球菌属(*Oenococcus*)、四联球菌属(*Tetragenococcus*)、漫游球菌属(*Vagococcus*)和魏斯氏菌属(*Weisella*)。

[0042] 厌氧细菌在自然界中普遍存在。厌氧细菌可以是专性厌氧的,或可以是兼性厌氧的。专性厌氧细菌的非限制性示例包括硫酸盐还原菌(SRB;诸如例如脱硫弧菌(*Desulfovibrio*)属物种和脱硫肠状菌(*Desulfotomaculum*)属物种)、产酸菌(APB;诸如例如醋杆菌属(*Acetobacterium*)、片球菌属(*Pediococcus*)、*Proteiniphilum*、乳杆菌属、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、*Thermococcoides*以及不动杆菌属(*Acinetobacter*))、放线菌属物种、梭菌属物种(例如,产气荚膜梭菌、破伤风梭菌(*C. tetani*)、生孢梭菌(*C. sporogenes*)、肉毒梭菌(*C. botulinum*)、艰难梭菌(*C. difficile*)、丁酸梭菌(*C. butyricum*)、丙酮丁醇梭菌(*C. acetobutylicum*))、乳酸菌(例如,乳杆菌属物种、明串珠菌属物种、片球菌属物种、乳球菌属物种)、拟杆菌属物种(例如脆弱拟杆菌(*B. fragilis*))以及消化链球菌属物种(例如,微小消化链球菌(*P. micros*)、大消化链球菌(*P. magnus*)、不解糖消化链球菌(*P. asaccharolyticus*)、厌氧消化链球菌(*P. anaerobius*)以及四链消化链球菌(*P. tetradius*))。兼性厌氧细菌的非限制性示例包括肠细菌(*Enterobacteria*) (例如,大肠杆菌(*E. coli*))、沙门氏菌属(*Salmonella*)菌种、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、李斯特菌属(*Listeria*)菌种(例如,单核细胞增多性李斯特菌(*L. monocytogenes*))。

[0043] 因为很多酵母菌种是兼性厌氧的,并且一部分酵母菌种是专性厌氧的,所以预期本发明公开的自主产生厌氧环境的培养装置也可用于培养并检测酵母微生物。

[0044] 在一个方面,本发明提供了一种用于培养并检测在低氧环境中生长的微生物的培

养装置。参考图1-图3,本公开的培养装置100包括防水基部10、防水盖片20、以及设置在基部10和盖片20之间的间隔构件30。基部10具有内表面10b和与内表面相对的外表面10a。盖片20具有内表面20b和与内表面相对的外表面20a。在任一实施方案中,基部10的内表面10b与盖片20的内表面20b以面向的关系设置。

[0045] 基部10优选地为相对刚性的防水膜,其由不吸水,或者说不受水不利影响的材料(例如,聚酯、聚丙烯或聚苯乙烯)制成。基部10优选地使用基本上不可透过气态氧的材料制成。基部10的合适材料的非限制性示例包括至少约15 μm 至至少约180 μm 厚的聚酯膜、至少约100 μm 至至少约200 μm 厚的聚丙烯膜、以及至少约300 μm 至约380 μm 厚的聚苯乙烯膜。其它合适的基部包含乙烯-乙醇共聚物膜、聚乙烯醇膜、以及聚偏二氯乙烯膜。如果希望透过基部观察菌落,则基部10可以是透明的。

[0046] 盖片20用于覆盖基部10的内表面10b,以限定生长隔室60,并且任选地,在运输、储存、温育和/或菌落计数期间用于观察生长隔室。盖片20优选地为相对刚性的防水膜,其由不吸水,或者说不受水不利影响的材料(例如,聚酯、聚丙烯或聚苯乙烯)制成。盖片20优选地是透明的,以便有利于在不打开培养装置100的情况下对菌落进行计数,并且基本上不可渗透微生物和水蒸气。

[0047] 一般来讲,盖片可由诸如用于制备基部10的那些材料制成。盖片20优选地使用基本上不可透过气态氧的材料制成。基部10的合适材料的非限制性示例包括至少约15 μm 至至少约180 μm 厚的聚酯膜、至少约100 μm 至至少约200 μm 厚的聚丙烯膜、以及至少约300 μm 至约380 μm 厚的聚苯乙烯膜。其它合适的基部包含乙烯-乙醇共聚物膜、聚乙烯醇膜、以及聚偏二氯乙烯膜。如图1所示,盖片20可沿着基部10和盖片20各自内表面的一个边缘,以折叶状方式(例如,使用双面胶带)附接,以形成折叶区70。任选地,在任一实施方案中,盖片20可包括延伸超过基部10的突片区75。可在打开装置100时便利地抓握突片区75,以用样品对生长隔室60进行接种。

[0048] 本领域的普通技术人员将会识到,可通过增大聚合物膜的厚度,来降低氧气穿透给定类型聚合物膜的百分比。在任一实施方案中,本公开的基部和盖片是具有气态氧基本上不可透过的合适厚度的聚合物膜。

[0049] 间隔构件30包括开口36。开口36形成用于限定培养装置100的生长隔室60的位置和厚度二者的凹槽。间隔构件30,连同基部10和盖片20一起限定生长隔室60的边界。间隔构件30有助于在培养装置100的接种期间将含水样品(未示出)限制在生长隔室60内。

[0050] 如图1所示的开口36限定圆形形状。然而,预期开口36可限定其它形状(例如,正方形、矩形、椭圆形)。开口36的壁提供了具有预先确定的尺寸和形状的凹槽,并限定了培养装置100的生长隔室60的厚度。

[0051] 间隔构件30应当足够厚,以根据生长隔室60的尺寸和待被放入培养装置中的样品的尺寸,形成具有预先确定的体积,例如1mL、2mL、3mL、5mL或10mL的凹槽。在任一实施方案中,间隔构件30由疏水的(不润湿)、对微生物惰性且可灭菌的任何无孔材料制成。在任一实施方案中,间隔构件30可与基部10或盖片20直接联接(例如,经由压敏粘合剂)。此外或另选地,间隔构件30可与基部或盖片间接联接(例如,经由胶带50)(例如,间隔构件可与被分别涂布到基部或盖片上的第一干燥涂层或第二干燥涂层联接)。

[0052] 生长隔室60可位于培养装置100中的位于基部10和盖片20之间的任何可触及的位

置。优选的是,生长隔室60位于远离装置100的周边边缘80的位置。

[0053] 优选地,间隔构件30由不实质抑制微生物的生长并且不实质吸收来自与间隔构件接触的水凝胶的水或宏观二氧化碳气泡的无孔材料(例如,金属、玻璃、聚合树脂)构造。可制造间隔构件30的合适的材料的非限制性示例包括例如聚烯烃(例如,聚乙烯、聚丙烯等)、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚氨酯、聚苯乙烯、聚偏二氯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚偏二氟乙烯或其它聚合物膜。

[0054] 本公开的装置包括布置在生长隔室中的干燥的冷水可溶胶凝剂。优选地,胶凝剂直接或间接地附着到装置100的基部10和/或盖片20。在任一实施方案中,胶凝剂可在装置100的生长隔室60中均匀地分布到基部10的内表面10b和/或盖片20的内表面20b上。

[0055] 第一干燥涂层24中使用的合适胶凝剂包括冷水可溶天然胶凝剂以及合成胶凝剂。天然胶凝剂(诸如,藻胶、羧甲基纤维素、塔拉胶、羟乙基纤维素、瓜尔胶、刺槐豆胶、黄原胶)与合成胶凝剂(诸如,聚丙烯酰胺、聚氨酯、聚环氧乙烷)及其混合物一般是合适的。可根据本公开的教导内容和美国专利4,565,783、5,089,413和5,232,838的公开内容选择适用的胶凝剂。优选的胶凝剂包括瓜尔胶、刺槐豆胶、黄原胶;这些胶凝剂可单独使用,优选地可彼此组合使用。

[0056] 因此,在任一实施方案中,本公开的装置100任选地可包括在生长隔室60中附着到基部10的至少一部分或所有内表面10b的第一干燥涂层14。第一干燥涂层14,如果存在,可包括干燥的冷水可溶胶凝剂。任选地,第一粘合剂层12附着到基部10,并且第一干燥涂层的至少一部分附着到生长隔室60中的第一粘合剂层。

[0057] 盖片20可不含任何涂层(未示出)。另选地,如果装置100不具有在生长隔室60中附着到基部10的内表面10b的第一干燥涂层14,那么盖片20可包括在生长隔室中与其附着的第二干燥涂层24。第二干燥涂层24,如果存在,可包括干燥的冷水可溶胶凝剂。任选地,第二粘合剂层22附着到盖片20并且第二干燥涂层24的至少一部分附着到生长隔室60中的第二粘合剂层。在任一实施方案中,第二粘合剂层22的层的一部分可用于有利于将盖片20密封至间隔构件30的至少一部分。

[0058] 就第一干燥涂层和第二干燥涂层来说,所述涂层任选地可包含任何营养物质或营养培养基,该营养物质或营养培养基可用冷水重构、基本上不妨碍除氧试剂(下文论述)或胶凝剂的冷水胶凝性质,并支持厌氧微生物生长。适用于培养装置的特定的一种或多种营养物质取决于将在该装置中生长的微生物,并且可由本领域技术人员轻松地选择出来。一般来讲,此类营养物质可溶于冷水。用于支持细菌生长的合适的营养物质是本领域已知的,并且包括但不限于酵母提取物、蛋白胨、糖类、合适的盐,等等。在任一实施方案中,第一和/或第二干燥涂层还可包含选择剂(例如,营养物质、抗生素及其组合),特定厌氧微生物或微生物群相比另外的微生物或微生物群,生长受该选择剂有利于的程度更强。本领域的技术人员将会认识到,可使用多种其它配方,并且这些配方不减损本发明的范围。

[0059] 在任一实施方案中,营养物质或营养培养基有利于特定厌氧微生物或厌氧微生物的组的生长。例如,在任一实施方案中,本公开的装置可用于使硫酸盐还原菌生长、对其进行鉴定和/或计数。在这些实施方案中,所述装置中使用的营养培养基可包括例如Postgate的B培养基的成分。

[0060] 优选地,当第一干燥涂层14主要由干燥粉末或干燥粉末的团聚体组成时,将第一

涂层14布置在第一粘合剂层12上,该粘合剂层布置在基部10的内表面10b的至少一部分上。可使用(例如)美国专利4,565,783、5,089,413和5,232,838中所述的配混方法、粘合剂涂布方法、以及液体涂布方法和/或干涂方法,将第一干燥涂层14沉积到基部10上,或沉积到任选的第一粘合剂层12上,前述专利均全文以引用方式并入本文。

[0061] 优选地,当第二干燥涂层24主要由干燥粉末或干燥粉末的团聚体组成时,将第二涂层24布置在第二粘合剂层22上,该粘合剂层布置在盖片20的内表面20b的至少一部分上。可使用(例如)美国专利4,565,783、5,089,413和5,232,838中所述的配混方法、粘合剂涂布方法、以及液体涂布方法和/或干涂方法,将第二干燥涂层24沉积到盖片20上,或沉积到任选的第二粘合剂层22上,前述专利均全文以引用方式并入本文。

[0062] 生长隔室60被限定为布置在位于基部10的内表面和盖片20的内表面(分别为内表面10b和20b)之间的体积,该体积包括第一干燥涂层14和/或第二干燥涂层24的至少一部分。因此,当含水液体分散到生长隔室中时,含水液体便与第一干燥涂层14(如果存在)和/或第二干燥涂层24(如果存在)的至少一部分发生流体接触。生长隔室60的厚度可取决于多种因素而变化,例如:沉积在培养装置中的含水液体(未示出)的体积,存在与样品(未示出)相关联的固体(例如,悬浮颗粒物和/或膜过滤器),和/或培养装置10中的间隔构件30。

[0063] 本公开的培养装置还包括有效量的干燥的除氧试剂。除氧试剂布置在生长隔室中。“干燥”,如本文所用,是指试剂基本上不含水。短语“基本上不含水”是指一旦其已被允许与周围环境平衡,具有不大于约材料(例如,作为粉末或作为脱水的含水涂层提供)的水含量的水含量的试剂。

[0064] 任选地,本公开的培养装置还可包括其它干燥的可再水合的组分,诸如缓冲剂的组分,和/或有效量的二氧化碳生成试剂。

[0065] 在如本文所述那样将样品材料引入(例如,接种到)培养装置的生长隔室中之前、期间或之后,至少一种干燥组分(例如,胶凝剂)与含水液体水合。通常,样品材料和/或含水液体在环境条件(即,有氧气体环境)下被引入培养装置的生长隔室中。因此,在有氧条件下用样品接种培养装置的生长隔室后,该生长隔室中的含水液体具有第一溶解氧浓度。培养装置中的除氧试剂起到将生长隔室中含水液体中的第一溶解氧浓度降低至基本上低于第一溶解氧浓度的第二溶解氧浓度的作用。由于接种过的培养装置的生长隔室中的溶解氧浓度的该降低,有利于专性厌氧微生物或微需氧微生物在培养装置中的生长。

[0066] 在任一实施方案中,选择除氧试剂的有效量及其浓度,使得在将除氧试剂与培养装置的生长隔室中预定体积的含水液体发生流体接触后,第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度在约120分钟内发生。在任一实施方案中,选择除氧试剂的有效量及其浓度,使得在将除氧试剂与培养装置的生长隔室中预定体积的含水液体发生流体接触后,第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度在约60分钟内发生。在任一实施方案中,选择除氧试剂的有效量及其浓度,使得在将除氧试剂与培养装置的生长隔室中预定体积的含水液体发生流体接触后,第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度在约30分钟内发生。

[0067] 在任一实施方案中,在环境温度(例如,约23℃)与约42℃之间(包括端值)的温度下,将第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度。因此,在根据本公开的方法的任一实施方案中,在使除氧试剂与培养装置的生长隔室中预定体积的含水液体发生流体接触后,为了将第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度,无需在升高的温度(即,高于环境温度)下温育培养

装置。

[0068] 本领域的普通技术人员将会认识到,在适于培养微生物的一段时间内,从本公开培养装置的生长隔室移除的氧量尤其取决于培养装置的生长隔室中除氧试剂的量。因此,通过调节根据本公开的生长隔室中除氧试剂的量,培养装置可被构造成用于培养微耐氧微生物或用于培养专性厌氧微生物。

[0069] 许多除氧试剂是已知的,包括例如,抗坏血酸(例如,L-抗坏血酸及其盐、亚铁盐、亚硫酸盐的金属盐、亚硫酸氢盐和偏亚硫酸氢盐)。根据本公开的合适的除氧试剂消耗足够的氧以在培养装置中产生低氧或厌氧的局部环境并且产生可与装置中待培养的微生物流体连通而不显著地抑制那些微生物生长的反应产物的量和类型。在任一实施方案中,除氧试剂以约 $1.5\mu\text{mol}/10\text{cm}^2$ 至约 $15\mu\text{mol}/10\text{cm}^2$ 的量布置在生长隔室中。

[0070] 优选地,在任一实施方案中,除氧试剂以干燥粉末的形式提供。更优选地,在任一实施方案中,除氧试剂作为干燥粉末提供,干燥粉末被研磨和分类以形成一组具有基本上由直径小于106微米的颗粒组成的粒度分布的颗粒。有利地,直径小于106微米的颗粒中提供的除氧试剂可以有效量附着到基部或盖片(例如,附着到涂覆到基部或盖片上的粘合剂层)以在装置接种有预定体积的含水液体并闭合时在生长隔室中产生并维持(例如,温育至多约24小时,温育至多约48小时,温育至多约72小时,温育至多4天,温育至多5天,温育至多7天,温育至少24小时,温育至少48小时,温育至少72小时,温育至少4天,温育至少5天,温育至少7天)厌氧环境。

[0071] 用于布置在盖片20上的任选的粘合剂层22中的粘合剂可与用于布置在基部10上的任选的粘合剂层12中的粘合剂相同或不同。此外,布置在盖片20上的第二干燥涂层24可与布置在基部10上的第一干燥涂层14相同或不同。盖片20上的涂层可覆盖面向基部的整个表面,但优选地至少覆盖内表面20b的限定培养装置100的生长隔室60的至少一部分的部分。

[0072] 在任一实施方案中,选择剂可在装置中布置在干燥涂层中,或任选地,溶解在生长隔室内的粘合剂层中。

[0073] 本公开的培养装置任选地还包括用于指示培养装置中的氧的构件。该构件优选地能够指示装置中存在的氧量(例如,预先确定的阈值量或相对量)。有利地,该构件可指示是否或何时除氧试剂已适当地耗尽培养装置的生长隔室中的氧至有利于微需氧微生物、微耐氧微生物或专性厌氧微生物生长的浓度。用于检测培养装置中的氧的构件是本领域已知的,包括(例如)氧化还原型染料(例如,亚甲蓝)和氧淬灭的荧光染料。

[0074] 该构件可以是指示装置内侧是否存在氧的发光化合物。美国专利6,689,438(Kennedy等人)中公开了合适的氧气指示剂,该专利全文以引用方式并入本文。适合用作本公开的培养装置中的指示剂的发光化合物将显示被氧淬灭的荧光。更确切地说,这些指示剂在暴露于它们的激发频率时将发光,发光强度与氧浓度成反比。该指示剂可被涂布、层合或挤压到所述装置内的另一层上,或另一层的一部分上。此类层可设置在生长隔室中,并且任选地通过一个或多个其它的透氧层与生长隔室分隔开。用于指示氧的合适的化合物包括八乙基卟啉、四苯基卟啉、四苯并卟啉、二氢卟吩或细菌卟吩的金属衍生物。其他合适的化合物包括粪卟啉钯(PdCPP)、八乙基卟啉铂和八乙基卟啉钯(PtOEP, PdOEP)、四苯基卟啉铂和四苯基卟啉钯(PtTPP, PdTPP)、樟脑醌(CQ)、氧杂蒽类染料(如赤藓红B(EB))。其它合适的

化合物包括钪、钇、铈与配体的配合物,其中配体诸如2,2'-二吡啶、1,10-邻二氮菲、4,7-二苯基-1,10-邻二氮菲等等。这些配合物的合适的示例包括三(4,7-二苯基-1,10-邻二氮菲)钪(II)高氯酸盐、三(2,2'-二吡啶)钪(II)高氯酸盐、三(1,10-邻二氮菲)钪(II)高氯酸盐,等等。

[0075] 本公开的培养装置任选包括布置在生长隔室中的有效量的干燥的二氧化碳生成试剂。不受理论的约束,当通过与生长隔室中的含水液体接触被激活时,二氧化碳生成试剂建立以下溶解物质的平衡:碳酸的一种或多种盐、碳酸和二氧化碳。有利地,有效量的二氧化碳生成试剂足以使溶解的二氧化碳升高至有利于多种微生物生长的浓度。

[0076] 优选地,在任一实施方案中,二氧化碳生成试剂以干燥粉末的形式提供。更优选地,在任一实施方案中,二氧化碳生成试剂作为干燥粉末提供,干燥粉末被研磨和分类以形成一组具有基本上由直径小于106微米的颗粒组成的粒度分布的颗粒。有利地,直径小于106微米的颗粒可附着到基部或盖片(例如,附着到涂覆到基部或盖片上的粘合剂层)以在装置接种有预定体积的含水液体并且闭合之后在生长隔室中产生并维持(例如,温育至多约24小时,温育至多约48小时,温育至多约72小时,温育至多4天,温育至多5天,温育至多7天,温育至少24小时,温育至少48小时,温育至少72小时,温育至少4天,温育至少5天,温育至少7天)富含CO₂的环境。

[0077] 本公开的培养装置任选地包括布置在生长隔室中的干燥的缓冲试剂,当与去离子水水合时,该缓冲试剂使水达到适于培养微生物并且任选地有选择性地使某些微生物组富集的预定pH。例如,在任一实施方案中,预定pH可为约5.2至约7.8。在任一实施方案中,预定pH可少于或等于6.35(例如,约4.5至约6.35)。这种微酸性pH提供若干优点:i)相对于样品中可能存在的其它微生物,酸性环境选择性地有利于耐酸性微生物(例如,LAB)的生长,以及ii)酸性环境可使碳生成试剂(如果存在的话)的平衡向更高比例的溶解CO₂移动。这两条优点均可有利于例如LAB在培养装置中的生长。

[0078] 用于本公开的装置中的缓冲试剂包括具有约8.0或更少pK_a的任何微生物相容的缓冲液。缓冲试剂的酸性或碱性部分以某一比率存在于培养装置中,该比率使得当预定体积的去离子水与缓冲试剂接触时,生长隔室中的pH适于特定微生物或微生物组的生长和检测。合适的缓冲试剂包括,例如,金属磷酸盐、金属乙酸盐、2-(N-吗啉代)乙磺酸和2-(N-吗啉代)乙磺酸钠,以及琥珀酸和琥珀酸钠。本领域的普通技术的人员将认识到,可调节酸性和碱性缓冲试剂的比率以便实现期望的含水混合物pH,含水混合物在预先确定的体积的含水液体(例如,包括样品)沉积在生长隔室中且装置闭合时形成。

[0079] 本公开的培养装置任选地包含指示试剂。合适的指示试剂(例如,氯化三苯基四氮唑(TTC))可检测存在于培养装置中的基本上所有的微生物。任选地,指示试剂可为差示指示剂;即,指示试剂将某些微生物与其它微生物区别开来。合适的指示试剂包括,例如,pH指示剂、氧化还原指示剂、显色酶底物、以及荧光酶底物,用于检测微生物的存在。指示剂不应显著地干扰除氧试剂。在任一实施方案中,指示试剂在装置中可布置在干燥涂层中,或任选地溶解于生长隔室内的粘合剂层中。

[0080] 本公开的培养装置任选地包括还原剂。合适的还原试剂可用于降低生长介质的氧化还原电势,并且从而有利于厌氧微生物的生长。合适的还原剂包括例如,巯基乙酸钠、L-半胱氨酸、二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇、以及它们的组合。

[0081] 在任一实施方案中,生长隔室的尺寸可被设定为与1ml含水液体体积水合。每毫升水包含约0.54摩尔溶解氧。因此,第一干燥涂层和/或第二干燥涂层优选地至少包含足量除氧试剂,所述足量除氧试剂在约22℃至约42℃温度下,可在120分钟或不足120分钟的一段时间内消耗掉0.54摩尔氧。更优选地,第一干燥涂层和/或第二干燥涂层优选地至少包含足量除氧试剂,所述足量除氧试剂在约22℃至约42℃温度下,可在120分钟或不足120分钟的一段时间内消耗掉0.54摩尔以上的氧。

[0082] 在任一实施方案中,第一干燥涂层和/或第二干燥涂层可包含任何量的其它组分,诸如染料(例如,pH指示剂)、交联剂、试剂(例如,选择试剂或指示试剂,诸如,显色酶底物或荧光酶底物),或者前述组分中任两种或更多种的组合。例如,就一些用途来说,需要将微生物生长指示剂(例如,pH指示剂、显色酶底物、氧化还原型染料)掺入第一干燥涂层和/或第二干燥涂层,或掺入第一和/或第二干燥涂层与之附着的粘合剂。合适的染料包括由生长的微生物代谢的那些染料,或与生长的微生物以其它方式反应,并且因而引起菌落着色或发荧光(使菌落更容易显现)的那些染料。此类染料包括氯化三苯基四唑、对甲苯基四唑红、四唑紫、藜芦基四唑蓝及相关染料,以及5-溴-4-氯吡啶磷酸二钠盐。其它合适的染料包括对微生物生长期间的pH值变化敏感的那些染料,诸如中性红。

[0083] 就一些用途来说,需要形成这样的干燥涂层:在用含水液体复水时,这种干燥涂层形成水凝胶,此水凝胶的刚性足以允许操作者利用划线法接种。为了形成可划线的培养基,可将有效量的合适的交联剂掺入包含胶凝剂的一个或多个干燥涂层。合适的交联剂基本上不影响预期的微生物的生长。本领域技术人员很容易选择出合适类型的交联剂及其合适的用量。例如,就瓜尔胶来说,适宜的交联剂为(诸如)四硼酸钾、铝盐或钙盐,可取有效量(例如,按干燥涂层的重量计少于约1.0%)的这些适宜交联剂添加。

[0084] 至少一个干燥涂层可任选地包含执行某些微生物检测所必需的试剂。例如,可包含抗生素,用于执行抗生素敏感性检测。对于微生物鉴定,可包含在存在特定类型微生物时经历变色的差别化试剂。

[0085] 在任一实施方案中,干燥的缓冲体系、还原剂、二氧化碳生成试剂和/或指示试剂可如不附着到第一粘合剂层或第二粘合剂层的干燥粉末(例如,图2和图3的干燥粉末40)布置在生长隔室中。另选地,干燥的缓冲体系、还原剂、二氧化碳生成试剂和/或指示试剂可如本文所述包括在第一和/或第二涂层中。

[0086] 可使用多种技术制备本发明的培养装置。一般来讲,本发明的培养装置可手工制造,也可利用本文所述以及例如美国专利4,565,783、5,089,413和5,232,838中描述的常见实验室设备制造。

[0087] 可用于第一粘合剂层和/或第二粘合剂层中的合适的压敏粘合剂的非限制性示例为丙烯酸2-甲基丁酯/丙烯酸以90/10摩尔比的共聚物。可使用的其它优选压敏粘合剂包括丙烯酸异辛酯与丙烯酸以95/5或94/6摩尔比共聚而成的共聚物,以及硅橡胶。暴露于水时变成乳状(例如,不透明)的粘合剂是次优选的,但可结合不透明的基部使用,或者在不要求菌落显现的情况下使用。还已知热活化粘合剂和/或水活化粘合剂(诸如黏胶),热活化粘合剂中的熔点较低物质被涂布在熔点较高物质上,这两种粘合剂都可用于本发明。在掺入上述指示试剂以便有利于菌落显现时,通常优选的是将指示试剂掺入粘合剂或肉汤涂层混合物而非粉末中。

[0088] 将第一粘合剂层和第二粘合剂层涂覆(例如,使用刮刀涂布机)到基部或盖片的顶部表面上以形成粘合剂层,该粘合剂层具有优选小于待粘附至粘合剂的干燥粉末或团聚粉末的平均粒径的厚度。一般来讲,为了将颗粒粘附至基底(例如,本文所述的第一或盖片),但不过多而使颗粒变得完全嵌入粘合剂中,涂覆足够量的粘合剂。一般来讲,约 $5\mu\text{m}$ 至约 $12\mu\text{m}$ 厚的粘合剂层是合适的。

[0089] 优选地,当第一干燥涂层和/或第二干燥涂层包含胶凝剂时,胶凝剂的用量使得被放入生长隔室的预先确定的量的水或含水样品(例如,1至3ml或更多)将形成粘度合适的水凝胶,该粘度(例如)在 25°C 下用Brookfield型L VF粘度计以60rpm测量时,为约1500cps或更大。水凝胶的这种粘度,允许操作者在温育期间搬运并堆叠培养装置,并且这种粘度的水凝胶支持培养基中形成清晰的菌落。例如,将0.025g至0.050g粉末状瓜尔胶在 20.3cm^2 的面积上基本上均匀地铺展开后,在用1至3ml含水样品重构时,这些粉末状瓜尔胶便会提供足够粘稠的培养基。可使用粉末颗粒的大小来控制每单位面积的涂布量。例如,在100目瓜尔胶涂层达到约 $0.05\text{g}/20.3\text{cm}^2$ 的重量的情况下,400目瓜尔胶涂层达到约 $0.025\text{g}/20.3\text{cm}^2$ 的重量。

[0090] 在任一实施方案中,第一干燥涂层或第二干燥涂层可包含一种或多种营养物质,以有利于微生物的生长。若所述涂层基本上由粉末或粉末团块组成,则粘附的粉末培养基中胶凝剂与营养物质的优选比率由待在培养装置上生长的特定微生物决定。然而,就一般用途来说,优选约4:1至约5:1的比率(胶凝剂总量比营养物质总量,基于重量计)。可采用任何适用于基本上均匀地施加粉末层的方式,将粘附的粉末培养基中的粉末施加到粘合剂层(例如,第一粘合剂层12和/或第二粘合剂层22)上。施加粉末层的合适的方法的示例包括使用振动式装置或粉末涂布机。

[0091] 本领域普通技术人员将认识到适用于在本公开的装置中使特定的微需氧、微耐氧或专性厌氧微生物生长并对其进行检测的营养物质。合适营养物质的非限制性示例包括蛋白胨源(例如,肉汁、肉蛋白胨)、酵母提取物、酪蛋白的酶消化、和碳水化合物(例如,麦芽糖、葡萄糖、海藻糖、蔗糖)。在任一实施方案中,碳水化合物可以是某些微生物发酵成葡萄糖的营养物质。优选地,碳水化合物在所述装置中的存在量足够高,以有利于微生物的生长(生物质产生)并且任选地,被微生物发酵,以形成可以作为微生物菌落附近的气泡检测的可检测量的 CO_2 。

[0092] 当使用本公开的培养装置时,可能希望对存在的微生物的菌落进行准确计数。因此,在任一实施方案中,本公开的培养装置可在基部上或另选地在盖片上包括网格图案。网格图案可包括方形网格图案,诸如例如,美国专利4,565,783中公开的方形网格图案。网格图案可通过任何合适的工艺(诸如例如,印刷方法),在第一或盖片上产生。

[0093] 在另一个方面,本公开提供了上述实施方案中任一项的制备产生厌氧环境的培养装置的方法。该方法包括使冷水可溶胶凝剂附着到基部的一部分。当附着到基部时,胶凝剂可为干燥的(例如,以基本上不含水的颗粒的形式),或者胶凝剂可作为液体涂层附着到基部(例如,含水液体涂层),并且随后干燥至基本上不含水的状态。所述方法还包括将基部定位在盖片附近且将间隔构件置于两者之间,间隔构件包括限定如本文所述的生长隔室的开口。在任一实施方案中,间隔构件可附接(例如,经由粘合剂)至基部或盖片。

[0094] 基部邻近盖片定位,使得附着的胶凝剂的至少一部分面向布置在基部和盖片之间

的生长隔室。任选地,在任一实施方案中,第一粘合剂层可施加(例如,使用本领域中已知的涂覆工艺)到基部并且冷水可溶胶凝剂可附着到第一粘合剂层。

[0095] 在另选的实施方案中,冷水可溶胶凝剂可通过用于使胶凝剂附着到基部描述的工艺中的任一种附着到盖片。如果胶凝剂是液体涂覆的,则干燥附着的胶凝剂可通过本领域中的多种工艺执行。可例如根据美国专利5,601,998中描述的工艺,在烘箱(例如,重力烘箱、对流烘箱)中干燥涂层,该专利全文以引用方式并入本文。优选地,干燥附着的胶凝剂,直到其基本上不含水。本文使用的短语“基本上干燥”、“基本上不含水”等,是指这样的涂层:一旦已允许其与周围环境平衡,则其含水量不超过大约已脱水涂层的含水量。

[0096] 所述方法还包括将除氧试剂、缓冲试剂以及二氧化碳生成试剂沉积到培养装置的生长隔室中。在任一实施方案中,任一种或所有除氧试剂、缓冲试剂以及二氧化碳生成试剂可作为干燥粉末沉积到生长隔室中。任选地,任一种或所有除氧试剂、缓冲试剂以及二氧化碳生成试剂可附着到生长隔室中的粘合剂(例如,如本文所述的第一粘合剂层或第二粘合剂层)。也可将其它任选的组分(例如,指示试剂、选择剂、营养物质)沉积到生长隔室中,任选地,附着到粘合剂层。

[0097] 将基部邻近盖片定位,使得附着的胶凝剂面向布置在基部和盖片之间的生长隔室可以多种方式执行。将基部和盖片邻近彼此定位使得胶凝剂的一部分与生长隔室重叠的代表性示例示于图1-图3中。可见该重叠构型允许操作者将含水液体沉积在基部和盖片之间,从而使得胶凝剂、除氧试剂、以及存在于生长隔室中的其它干燥组分流体连通。

[0098] 在又一方面,本公开提供了一种检测微生物的方法。该方法使用上文所述的任一实施方案的培养装置的任一实施方案。培养装置包括基部;盖片;设置在基部和盖片的内表面之间的间隔构件,间隔构件包括限定生长隔室的形状和深度的开口;在生长隔室中附着到基部或盖片的干燥的冷水可溶胶凝剂;以及布置在如本文所述的生长隔室中的有效量的干燥的除氧试剂。

[0099] 在任一实施方案中,所述方法包括打开培养装置以提供通向生长隔室的通道,将预定体积的含水液体放入生长隔室中,将样品放入生长隔室中,闭合培养装置,将培养装置温育足以允许在培养基中形成微生物菌落的时间段,以及检测微生物菌落,其中将含水液体和样品放入生长隔室中并闭合培养装置包括形成由培养装置的基部、盖片和间隔件包封的半固体微生物培养基。

[0100] 在任一实施方案中,用于水合和/或接种培养装置的含水液体的预先确定的体积为约0.1毫升至约10毫升。在任一实施方案中,用于水合和/或接种培养装置的含水液体的预先确定的体积为约1毫升。在任一实施方案中,用于水合和/或接种培养装置的含水液体的预先确定的体积为约2毫升。在任一实施方案中,用于水合和/或接种培养装置的含水液体的预先确定的体积为约3毫升。在任一实施方案中,用于水合和/或接种培养装置的含水液体的预先确定的体积为约4毫升。在任一实施方案中,用于水合和/或接种培养装置的含水液体的预先确定的体积为约5毫升。在任一实施方案中,用于水合和/或接种培养装置的含水液体的预先确定的体积为约10毫升。在任一实施方案中,用于水合培养装置的生长区域的含水液体分散于生长区域内,每20.3cm²生长区域内约有1毫升液体。

[0101] 在方法的任一实施方案中,将预先确定的体积置于生长隔室中包括同时将样品置于生长隔室中。例如,样品可为液体(例如,待测试微生物污染的水或饮料样品)或者样品可

为悬浮在液体载体或稀释剂中的固体或半固体样品。

[0102] 另选地,在任一实施方案中,将预先确定的体积置于生长隔室中不包括同时将样品置于生长隔室中。例如,样品可包括在将预定体积的(优选无菌的)液体载体或稀释剂置于培养装置的生长隔室中之前或之后置于生长隔室中的液体、固体、或半固体材料。

[0103] 通常将培养装置放置在大致水平的表面上,将基部和盖片分开(例如,抬起盖片),以在水合和/或接种培养装置的生长隔室的同时,提供通向该生长隔室的通道。有利地,可以在有氧环境中(即,空气中)水合和/或接种培养装置。通常,将用于水合培养装置的含水液体(其可包含待测试的样品材料)移取到基部和盖片之间的生长隔室上。将预定体积的含水液体沉积到生长隔室中之后,闭合培养装置(例如,通过放下盖片,直到其接触间隔构件)。可任选地使用平面或凹面涂布器(与用于接种PETRIFILM培养装置的那些涂布器类似),将含水液体散布于培养装置内的预定义面积上。

[0104] 在方法的任一实施方案中,将预先确定的体积置于生长隔室中可包括同时将样品置于生长隔室中。在这些实施方案中,样品可包含含水液体和/或样品可被稀释成含水液体或悬浮在含水液体中。

[0105] 另选地,在任一实施方案中,将预先确定的体积置于生长隔室中不包括同时将样品置于生长隔室中。在这些实施方案中,可在将样品置于生长隔室中之前或之后将预先确定的体积的含水液体置于(例如,移取的)生长隔室中。例如,样品可被捕集到膜过滤器上,在胶凝剂与含水液体水合之前或之后,膜过滤器被置于生长隔室中。

[0106] 在方法的任一实施方案中,将样品置于生长隔室中包括将一种或多种添加剂置于生长隔室中。可将一种或多种添加剂与样品一起或单独地置于生长隔室中。一种或多种添加剂在该方法中可执行多种功能。例如,在任一实施方案中,一种或多种添加剂可包括营养物质或营养培养基以有利于微需氧、微耐氧或专性厌氧微生物在装置中的生长。此类营养物质和营养培养基是本领域熟知的,并且可基于特定的待培养微生物进行选择。营养物质和营养培养基不应显著地干扰除氧试剂。这可通过使用如PCT公布W02015/061213的实施例2-实施例3中所述的氧气传感器容易地测试,所述公布全文以引用方式并入本文。

[0107] 此外或另选地,在任一实施方案中,添加剂包括一种或多种选择剂(例如,抗生素、盐),一种微生物相比至少一种另外的微生物,生长受该选择剂促进的程度更强。在实施方案中,相对于样品中存在的其它微生物,选择剂促进一种微生物的生长。此外或另选地,在任一实施方案中,添加剂包括指示试剂(例如,pH指示剂、氧化还原指示剂、显色酶底物、荧光酶底物),用于检测是否存在某种微生物。本领域的普通技术人员将会认识到适用于检测某些微生物的选择剂和指示试剂。选择剂和/或指示剂不应显著地干扰除氧试剂。这可易于如上文所述通过使用氧传感器测试。

[0108] 在任一实施方案中,有效量的选择剂基本上允许培养装置中乳酸菌的萌发和生长,并且有效量的选择剂基本上抑制大肠杆菌(*E.coli*)、金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)、产孢梭菌(*C.sporogenes*)、产气荚膜梭菌(*C.perfringens*)、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)、产黑色素普雷沃氏菌(*Prevotella melaninogencia*)和/或梭杆菌属(*Fusobacterium*)物种的生长。

[0109] 当被生长隔室中的含水液体接触时;干燥组分(例如,除氧试剂、缓冲试剂、二氧化碳生成试剂、营养物质、指示试剂、还原剂、和/或选择剂)和含水液体形成包括第一溶解氧

浓度和第一溶解二氧化碳浓度的混合物。

[0110] 在任一实施方案中,生长隔室中的含水混合物中的第一溶解氧浓度可为基本上抑制专性厌氧微生物、微需氧微生物和/或微耐氧微生物的生长的浓度。在这些实施方案中,使组分用含水流体连通,引发除氧反应,从而将生长隔室中的含水液体中的第一溶解氧浓度降至低于第一浓度的第二浓度(例如,比第一浓度低至少约25%、至少约50%、低至少约60%、低至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、低至少约99%、或低大于99%)。

[0111] 在任一实施方案中,将第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度可包括将生长隔室中的含水混合物中的溶解氧降至足够低的第二浓度,以支持LAB的生长(例如,耐氧LAB或专性厌氧LAB)。

[0112] 在任一实施方案中,将第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度包括在形成混合物之后短于或等于约120分钟内,将生长隔室中的含水混合物中的溶解氧降至第二浓度。在任一实施方案中,将第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度包括在形成混合物之后短于或等于约90分钟内,将生长隔室中的含水混合物中的溶解氧降至第二浓度。在任一实施方案中,将第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度包括在形成混合物之后短于或等于约60分钟内,将生长隔室中的含水混合物中的溶解氧降至第二浓度。在任一实施方案中,将第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度包括在形成混合物之后短于或等于约45分钟内,将生长隔室中的含水混合物中的溶解氧降至第二浓度。在任一实施方案中,将第一溶解氧浓度降至第二溶解氧浓度包括在形成混合物之后短于或等于约30分钟内,将生长隔室中的含水混合物中的溶解氧降至第二浓度。

[0113] 在任一实施方案中,生长隔室中的含水混合物中的第一溶解二氧化碳浓度可为支持微生物的生长的浓度。然而,样品中的一些或所有微生物在CO₂富集的环境中可更快地积累生物物质。因此,在这些实施方案中,使组分与任选的二氧化碳生成试剂处于水性流体连通引发二氧化碳生成反应,从而使生长隔室中的含水混合物中可获得二氧化碳的第一浓度增加至高于(例如,约2倍于第一浓度、约4倍于第一浓度、约5倍于第一浓度、约9.4倍于第一浓度)第一浓度的第二浓度(例如,在<90分钟内、在<60分钟内或在<30分钟内)。当将本公开的培养装置接种并温育时,另外的可获得二氧化碳不导致在生长隔室中形成的宏观(即,≥1mm直径气泡)水凝胶的形成。因此,包含二氧化碳生成试剂的培养装置可在涉及发酵碳水化合物至CO₂气体(其作为菌落附近的气泡积累)的发酵的方法中使用。

[0114] 如果在将样品材料置于装置中之前将培养装置水合,则重新打开装置,以用培养材料接种之前,任选地可允许冷水可溶的胶凝剂(例如,在室温下)水合数分钟直至约30分钟或更长时间,并且形成凝胶。在其中胶凝剂被允许水合并形成凝胶的时间期间,除氧试剂将水合胶凝剂中的溶解氧浓度从第一浓度降至有利于微耐氧或专性厌氧微生物的生长的第二浓度,如本文所论述。

[0115] 在培养装置的生长隔室被水合之前或之后,可采用本领域已知的多种方式使样品材料与生长隔室接触。在任一实施方案中,通过将样品材料沉积到生长区域中,来使样品材料与生长区域接触。将样品材料沉积到生长隔室中可通过(例如)下列方式实现:用移液器移取样品材料;使生长隔室与用于获取样品材料的拭子接触(例如,用拭子擦拭表面);使生长隔室与接种环或接种针接触(例如,采用平板划线技术);或者将样品捕获装置(如拭子、

海绵或膜滤器)间接地放置到生长隔室中,随后重新闭合培养装置。在样品沉积并且培养装置重新闭合之后(注意不要在培养装置中夹带宏观可见的气泡),除氧试剂恢复生长隔室中的溶解氧的耗尽。

[0116] 在任一实施方案中,培养装置的生长隔室中的干燥组分发生水合,并且胶凝剂形成凝胶之后,可将该培养装置用作接触板(例如,Rodac板)。因此,在形成凝胶之后,将培养装置的基部和盖片分开,从而暴露水合凝胶。让水合凝胶与待取样的表面接触,并且重新闭合培养装置,注意不要让肉眼可见的气泡陷入培养装置。重新闭合装置使水合凝胶返回培养装置内部的生长隔室。有利地,接触平板过程可在有氧环境中且在重新闭合培养装置之后执行,可通过除氧试剂在培养装置中重新建立低氧环境。

[0117] 在所述方法的任一实施方案中,在将样品置于生长隔室中并闭合之后,将培养装置温育一段时间(例如,预先确定的时间段)。温育条件(例如,温育温度)可影响微生物的生长速率,如本领域的普通技术人员所熟知。例如,在较低温度(例如,低于约25℃)下温育可允许检测嗜冷微生物。在较高温度(例如,约30℃、约32℃、约35℃、约37℃)下温育可有利于某些嗜常温微生物更快速生长。

[0118] 在一些实施方案中,在温育之后,可将培养装置温育至少约16小时、至少约18小时、至少约24小时或至少约48小时。在一些实施方案中,可将培养装置温育不超过约24小时、不超过约48小时或不超过约72小时。在某些优选的实施方案中,将培养装置温育约24小时至约48小时。在任一实施方案中,在检测生长隔室中生长的微生物菌落或对其进行计数前,可温育培养装置并在其中维持低氧环境约72小时、约96小时、约120小时、约7天或约8天。在任一实施方案中,将培养装置温育足以允许形成微生物菌落的时间段包括在有氧气氛中将培养装置温育该时间段(即,培养装置不被置于用于温育的还原氧容器或手套箱中)。

[0119] 温育接种的培养装置之后,所述方法还包括检测微生物菌落。可在培养装置中通过本领域已知的多种技术检测微生物菌落。在合适的温育期之后,可通过可观察到的菌落的不存在、生长指示剂(例如,pH指示剂、显色酶底物、氧化还原指示剂,诸如TTC、荧光酶底物)无变化和生长培养基中与可发酵碳水化合物的代谢相关联的气泡的不存在来在培养装置中检测微生物的不存在。

[0120] 可通过目视和/或通过利用成像系统来检测与微生物菌落相关联的酸区域。例如,在其中培养基包含溴甲酚紫作为pH指示剂的方法中,培养基将在约中性pH下具有紫色或灰色外观。随着微生物在培养基中生长并发酵碳水化合物(例如,葡萄糖),在邻近生长的细菌菌落处溴甲酚紫指示剂将显示出黄色。例如,在其中培养基包含氯酚红作为pH指示剂的方法中,培养基将在约中性pH下具有红色或紫罗兰色外观。随着微生物在培养基中生长并发酵碳水化合物,在邻近生长的微生物菌落处氯酚红指示剂将显示出黄色。

[0121] 气泡,如果存在于生长隔室中并且与微生物菌落相关联(例如,触摸菌落或在距菌落约1mm或更少的某一距离内),则可在视觉上和/或通过使用成像系统检测。气泡可与可见的菌落和/或可通过邻近微生物菌落的区域中的pH指示剂的颜色改变检测的酸区域相关联。例如,气泡可包含由碳水化合物的厌氧发酵生成的二氧化碳。

[0122] 在上述实施方案的任一者中,所述方法还可包括获取培养装置的图像。在这些实施方案中,检测LAB的存在与否包括显示、打印或分析所述培养装置的图像。该成像系统包

括成像装置并且可包括处理器。在一些实施方案中,成像装置可包括线扫描仪或面扫描仪(例如,相机)。成像装置可包括单色(例如,黑白)或多色(例如,彩色)扫描仪。有利地,单色成像系统可提供较高分辨率的图像,这可提高结果的准确性和/或减少检测所述培养装置中微生物的存在所需的时间。

[0123] 在一些实施方案中,成像系统还包括照明系统。照明系统可包括至少一个广谱可见光(例如,“白”光)源。在一些实施方案中,照明系统可包括至少一个窄谱可见光源(例如,发射相对较窄带宽的可见光,诸如例如红光、绿光或蓝光的发光二极管)。在某些实施方案中,照明系统可包括光发射峰在预选波长(例如,约525nm处)的窄谱可见光源(例如,发光二极管)。

[0124] 图像可从由培养装置的生长隔室中的组分(例如,微生物菌落、生长培养基和指示剂)反射的光获得,或者图像可从透射通过培养装置的生长隔室中的组分的光获得。合适的成像系统和相应的照明系统在例如国际专利公布WO 2005/024047和美国专利申请公布US 2004/0101954和US 2004/0102903中有描述,这些专利中的每一者都以引用方式全文并入本文。合适的成像系统的非限制性示例包括得自3M公司(明尼苏达州圣保罗市(St. Paul, MN))的PETRIFILM读板机(PPR),得自Spiral Biotech公司(马萨诸塞州诺伍德(Norwood, MA))的PETRISCAN菌落计数器,以及得自Synbiosis公司(英国剑桥(Cambridge, U.K.))的PROTOCOL和ACOLYTE平板扫描仪。

[0125] 在一些实施方案中,获取图像包括获取波长偏置图像。例如,成像系统可包括将由成像装置采集的光线偏置的偏置滤波器。滤波器元件是本领域已知的,并且包括“截止”滤波器(即,允许某个指定波长以上或以下的光波长通过的滤波器)和“带通”滤波器(即,允许某个指定上限和下限之间的光波长通过的滤波器)。可将偏置滤波器定位在照明源和培养装置之间。另选地或除此之外,可将偏置滤波器定位在培养装置和成像装置之间。

[0126] 示例性实施方案

[0127] 实施方案A为一种用于对微生物的菌落进行计数的培养装置,所述装置包括:

[0128] 基部,所述基部具有相对的内表面和外表面;

[0129] 盖片,所述盖片具有相对的内表面和外表面;

[0130] 设置在所述基部和所述盖片之间的间隔构件,其中所述间隔构件联接至所述基部或所述盖片,其中所述间隔构件包括限定生长隔室的形状和深度的开口,其中所述间隔构件和所述生长隔室布置在所述基部的所述内表面和所述盖片的所述内表面之间;

[0131] 在所述生长隔室中附着到所述基部的第一粘合剂层或在所述生长隔室中附着到所述盖片的第二粘合剂层;

[0132] 附着到所述第一粘合剂层或所述第二粘合剂层的有效量的干燥的除氧试剂;

[0133] 其中所述除氧试剂基本上由直径小于106微米的颗粒组成;以及

[0134] 附着到所述第一或第二粘合剂层的干燥的冷水可溶胶凝剂;

[0135] 其中所述盖片联接至所述基部或联接至所述间隔构件。

[0136] 实施方案B为根据实施方案A所述的培养装置,其中所述除氧试剂基本上由直径小于106微米的颗粒组成。

[0137] 实施方案C为根据实施方案A或实施方案B所述的培养装置,所述培养装置还包括在所述生长隔室中附着到所述第一粘合剂层或所述第二粘合剂层的有效量的干燥的二氧

化碳生成试剂。

[0138] 实施方案D为根据前述实施方案中任一项所述的培养装置,其中所述二氧化碳生成试剂基本上由直径小于106微米的颗粒组成。

[0139] 实施方案E为根据前述实施方案中任一项所述的培养装置,其中所述间隔构件是无孔的。

[0140] 实施方案F为根据前述实施方案中任一项所述的培养装置,所述培养装置还包括布置在所述生长隔室中的有效量的干燥的缓冲试剂。

[0141] 实施方案G为根据实施方案F所述的培养装置,其中所述缓冲试剂在所述生长隔室中附着到所述基部或所述盖片。

[0142] 实施方案H为根据实施方案G所述的培养装置,其中所述缓冲试剂附着到所述第一粘合剂层或所述第二粘合剂层。

[0143] 实施方案I为根据前述实施方案中任一项所述的培养装置,所述培养装置还包括有利于目标微生物的生长的干燥的营养物质。

[0144] 实施方案J为根据实施方案I所述的培养装置,其中所述营养物质包括发酵碳水化合物。

[0145] 实施方案K为根据实施方案J所述的培养装置,其中所述碳水化合物选自葡萄糖、麦芽糖、蔗糖以及海藻糖组成的组。

[0146] 实施方案L为根据实施方案I至K中任一项所述的培养装置,其中所述营养物质在所述生长隔室中附着到所述基部或所述盖片。

[0147] 实施方案M为根据实施方案L所述的培养装置,其中所述营养物质附着到所述第一粘合剂层或所述第二粘合剂层。

[0148] 实施方案N为根据前述实施方案中任一项所述的培养装置,所述培养装置还包括用于检测目标厌氧微生物的生长的第一指示试剂。

[0149] 实施方案O为根据实施方案N所述的培养装置,其中所述第一指示试剂在所述生长隔室中附着到所述基部或所述盖片。

[0150] 实施方案P为根据实施方案O所述的培养装置,其中所述营养物质附着到所述第一粘合剂层或所述第二粘合剂层。

[0151] 实施方案Q为根据前述实施方案中任一项所述的培养装置,所述培养装置还包括有效量的选择剂以抑制非目标微生物的生长。

[0152] 实施方案R为根据实施方案Q所述的培养装置,其中所述选择剂选自环己酰亚胺、多烯大环内酯、两性霉素B、游霉素以及菲律宾菌素组成的组。

[0153] 实施方案S为根据实施方案Q或实施方案R所述的培养装置,其中所述选择剂在所述生长隔室中附着到所述基部或所述盖片。

[0154] 实施方案T为根据实施方案S所述的培养装置,其中所述选择剂附着到所述第一粘合剂层或所述第二粘合剂层。

[0155] 实施方案U为根据前述实施方案中任一项所述的培养装置,所述培养装置还包括有效量的还原剂。

[0156] 实施方案V为根据实施方案U所述的培养装置,其中所述还原剂选自硫代乙醇酸钠、二硫苏糖醇以及二硫赤藓糖醇组成的组。

[0157] 实施方案W为根据实施方案U或实施方案V所述的培养装置,其中所述还原剂在所述生长隔室中附着到所述基部或所述盖片。

[0158] 实施方案X为根据实施方案W所述的培养装置,其中所述还原剂附着到所述第一粘合剂层或所述第二粘合剂层。

[0159] 实施方案Y为根据实施方案D至X中任一项所述的培养装置,其中所述二氧化碳生成试剂包括金属碳酸盐。

[0160] 实施方案Z为根据实施方案Y所述的培养装置,其中所述金属碳酸盐选自由碳酸氢钠和碳酸钠组成的组。

[0161] 实施方案AA为根据前述实施方案中任一项所述的培养装置:

[0162] 其中所述基部的所述内表面具有附着到其上的所述第一粘合剂;

[0163] 其中布置在所述生长隔室中的一种或多种第一组分附着到所述第一粘合剂;

[0164] 其中所述第一组分选自由所述胶凝剂、所述除氧试剂、所述缓冲试剂、所述营养物质、所述指示试剂、所述选择剂、所述还原剂、以及前述第一组分中的任何两个或更多个的组合组成的组。

[0165] 实施方案AB为根据实施方案AA所述的培养装置:

[0166] 其中第二组布置在所述第一粘合剂中;

[0167] 其中所述第二组分选自由所述指示试剂、所述选择剂以及它们的组合组成的组。

[0168] 实施方案AC为根据前述实施方案中任一项所述的培养装置:

[0169] 其中所述盖片的所述内表面具有附着到其上的所述第二粘合剂;

[0170] 其中布置在所述生长隔室中的一种或多种第三组分附着到所述第二粘合剂;

[0171] 其中所述第三组分选自由所述胶凝剂、所述除氧试剂、所述缓冲试剂、所述营养物质、所述指示试剂、所述选择剂、所述还原剂、以及前述第三组分中的任何两个或更多个的组合组成的组。

[0172] 实施方案AD为根据实施方案AC所述的培养装置:

[0173] 其中第四组布置在所述第二粘合剂中;

[0174] 其中所述第四组分选自由所述指示试剂、所述选择剂以及它们的组合组成的组。

[0175] 实施方案AE为根据前述实施方案中任一项所述的培养装置,其中所述除氧试剂包括亚铁或其盐或抗坏血酸或其盐。

[0176] 实施方案AF为根据前述实施方案中任一项所述的培养装置,所述培养装置还包括布置在所述生长隔室中的第二干燥指示试剂,其中所述第二指示试剂指示非目标微生物和目标微生物的存在。

[0177] 实施方案AG为根据前述实施方案中任一项所述的培养装置,其中所述除氧试剂布置在所述生长隔室中,其量为约 $1\mu\text{mol}/10\text{cm}^2$ 至约 $15\mu\text{mol}/10\text{cm}^2$ 。

[0178] 实施方案AH为根据前述实施方案中任一项所述的培养装置,其中所述二氧化碳生成试剂布置在所述生长隔室中,其量为约 $1\mu\text{mol}/10\text{cm}^2$ 所述生长隔室中所述基部或所述盖片的表面积至约 $35\mu\text{mol}/10\text{cm}^2$ 所述生长隔室中所述基部或所述盖片的表面积。

[0179] 实施方案AI为一种检测样品中微生物的方法,所述方法包括:

[0180] 将根据前述实施方案中任一项所述的培养装置放置于开放构型中,其中所述开放构型提供通向所述生长隔室的通道;

- [0181] 将预定体积的含水液体放入所述生长隔室中；
- [0182] 将样品放入所述生长隔室中；
- [0183] 闭合所述培养装置；
- [0184] 其中将所述含水液体和所述样品放入所述生长隔室中并且闭合所述培养装置包括形成由所述培养装置的所述基部、所述盖片和所述间隔件包封的半固体微生物培养基；
- [0185] 将所述培养装置温育足以允许在所述培养基中形成微生物菌落的时间段；以及
- [0186] 检测所述微生物菌落。
- [0187] 实施方案AJ为根据实施方案AI所述的方法，其中将所述预先确定的体积放入所述生长隔室中包括同时将所述样品放入所述生长隔室中。
- [0188] 实施方案AK为根据实施方案AI所述的方法，其中将所述预先确定的体积放入所述生长隔室中不包括同时将所述样品放入所述生长隔室中。
- [0189] 实施方案AL为根据实施方案AK所述的方法，其中将所述样品放入所述生长隔室中发生在将所述预先确定的体积放入所述生长隔室中之后。
- [0190] 实施方案AM为根据实施方案AK所述的方法，其中将所述样品放入所述生长隔室中发生在将所述预定体积放入所述生长隔室中之前。
- [0191] 实施方案AN为根据实施方案AI至AM中任一项所述的方法，其中将所述样品放入所述生长隔室中包括将添加剂放入所述生长隔室中。
- [0192] 实施方案AO为根据实施方案AI至AN中任一项所述的方法，其中将所述添加剂放入所述生长隔室中包括放入有效量的选择剂或指示剂。
- [0193] 实施方案AP为根据实施方案AO所述的方法，其中所述有效量的所述选择剂基本上允许所述培养装置中乳酸菌的生长，并且所述有效量的选择剂基本上抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、产孢梭菌、产气荚膜梭菌、脆弱拟杆菌、产黑色素普雷沃氏菌和/或梭杆菌属物种的生长。
- [0194] 实施方案AQ为根据实施方案AI至AP中任一项所述的方法，其中将所述培养装置温育一定时间段包括将所述培养装置在有氧气氛中温育所述时间段。
- [0195] 实施方案AR为根据实施方案AI至AQ中任一项所述的方法，其中在将所述培养装置温育之后检测所述微生物菌落还包括对所述培养装置中的一个或多个可目测检测的菌落进行计数。
- [0196] 实施方案AS为根据实施方案AI至AR中任一项所述的方法，其中所述培养装置包括布置在所述生长隔室中的所述指示试剂，其中检测所述微生物菌落包括检测与所述指示试剂相关联的光学变化，其中所述光学变化在所述微生物菌落附近检测。
- [0197] 实施方案AT为根据实施方案AS所述的方法，其中所述光学变化包括颜色变化。
- [0198] 实施方案AU为根据实施方案AI至AT中任一项所述的方法，其中检测所述微生物菌落包括目测检测所述生长隔室中所述菌落附近的气泡。
- [0199] 实施方案AV为根据实施方案AR至AU中任一项所述的方法，其中对一个或多个微生物菌落计数还包括将产生二氧化碳的菌落与不产生二氧化碳的菌落区分开。
- [0200] 通过以下实施例进一步说明本发明的目的和优点，但是在这些实施例中所述的具体材料和其量，以及其它条件和细节不应被理解为不适当地限制本发明。
- [0201] 实施例

[0202] 实施例1.自主产生厌氧环境的培养装置的制备。

[0203] 构造根据图1的培养装置的自主产生厌氧环境的培养装置。第一基底由5密耳(0.127mm)厚的聚酯膜(MELINEX等级377,双轴向取向的聚酯(PET)膜,购自弗吉尼亚州切斯特的杜邦帝人公司(DuPont Teijin;Chester,VA))组成。将营养物质粉末制剂(在表1中列出)和瓜尔胶(16g/L)在去离子水中搅拌以实现基本上均匀的混合物。混合物的pH的目标是5.8+/-0.5,如果需要,用酸或碱调节以满足目标值。如美国专利4,565,783所述,将该混合物刮刀涂布到第一基底上,并在对流烘箱中于210°F(98.9℃)下干燥8分钟。将营养物质层涂布至目标涂层重量(干燥后)为0.56g/24in²(3.6mg/cm²)的厚度。干燥之后,经由压敏粘合剂(与2重量%的丙烯酸共聚的98重量%的丙烯酸异辛酯)的薄层将大约20密耳(0.508mm)厚的聚乙烯膜间隔件(威斯康辛州布卢默的Optimum Plastics公司(Optimum Plastics, Bloomer,WI))附着至第一基底上的干燥涂层。间隔件包含直径为2 3/8英寸(6.03cm)的圆形开口,所述开口限定装置的生长隔室的周边。

[0204] 将抗坏血酸钠(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich Corporation,St.Louis,Mo))和碳酸氢钠(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich Corporation))单独研磨,然后使其通过140目筛网(得到小于106微米的颗粒尺寸)。制备了瓜尔胶(89.75重量%,可购自丹麦哥本哈根的杜邦丹尼斯克公司(DuPont Danisco,Copenhagen,Denmark))、经筛分的抗坏血酸钠(10重量%)和经筛分的碳酸氢钠(0.25重量%)的均匀混合物。第二基底由透明的聚酯(PET)膜(0.073mm厚)组成,在所述膜的一侧上涂布有涂层重量为0.2g/24in²(1.3mg/cm²)的第二压敏粘合剂(与4%丙烯酰胺共聚的96重量%的丙烯酸异辛酯)。然后将瓜尔胶、经筛分的抗坏血酸钠和经筛分的碳酸氢钠的均匀混合物粉末涂布到第二基底的粘合剂上。使用双面胶带将第二基底沿着一个边缘附接到第一基底,并将装置切割成与图1所示那些矩形相似的大约3英寸(7.6cm)×4英寸(10.1cm)的矩形。第二基底的经过涂布的那侧被取向成面向间隔件和生长隔室。

[0205] 表1.用于涂布实施例1的装置的第一基底的营养物质粉末制剂。

[0206]	组分	量 (g/L)	来源
	酪蛋白的酶消化	10	马里兰州巴尔的摩的 Alpha Biosciences 公司 (Alpha Biosciences; Baltimore, MD)
	猪蛋白胨	10	马里兰州巴尔的摩的 Alpha Biosciences 公司 (Alpha Biosciences, Baltimore, MD)
	酵母提取物	4	马里兰州巴尔的摩的 Alpha Biosciences 公司 (Alpha Biosciences, Baltimore, MD)
	柠檬酸铵	1	宾夕法尼亚州森特瓦利的艾万拓公司(Avantor, Center Valley, PA)
	醋酸钠	2.5	马萨诸塞州比尔里卡的 EMD 米利波尔(EMD Millipore, Billerica, MA)
	中性红染料	0.1	密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO)

[0207]

硫酸镁七水合物	0.2	宾夕法尼亚州森特瓦利的艾万拓公司(Avantor, Center Valley, PA)
硫酸锰一水合物	0.05	马萨诸塞州比尔里卡的 EMD 米利波尔 (EMD Millipore, Billerica, MA)
2-(N-吗啉代)乙磺酸	23.45	宾夕法尼亚州森特瓦利的艾万拓公司(Avantor, Center Valley, PA)
2-(N-吗啉代)乙磺酸钠盐	7.05	美国俄亥俄州索伦的 Amresco 公司 (Amresco, Solon, OH)
葡萄糖	20	加利福尼亚州圣玛丽亚的 Hardy Diagnostics 公司(Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA)
麦芽糖	20	美国俄亥俄州索伦的 Amresco 公司 (Amresco, Solon, OH)
聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯	1.08	美国俄亥俄州索伦的 Amresco 公司 (Amresco, Solon, OH)
两性霉素 B	0.01	密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO)

[0208] 实施例2

[0209] 根据实施例1的描述制备自主产生厌氧环境的培养装置,不同的是用瓜尔胶(89.7重量%)、抗坏血酸钠(10重量%)和碳酸氢钠(0.3重量%)的粉末混合物涂布第二基底的粘合剂,而不是用实施例1的粉末混合物进行涂布。

[0210] 实施例3

[0211] 根据实施例1的描述制备自主产生厌氧环境的培养装置,不同的是用瓜尔胶(89.5重量%)、抗坏血酸钠(10重量%)和碳酸氢钠(0.5重量%)的粉末混合物涂布第二基底的粘合剂,而不是用实施例1的粉末混合物进行涂布。

[0212] 实施例4

[0213] 根据实施例1的描述制备自主产生厌氧环境的培养装置,不同的是用瓜尔胶(89.0重量%)、抗坏血酸钠(10重量%)和碳酸氢钠(1.0重量%)的粉末混合物涂布第二基底的粘合剂,而不是用实施例1的粉末混合物进行涂布。

[0214] 实施例5

[0215] 根据实施例1的描述制备自主产生厌氧环境的培养装置,不同的是用瓜尔胶(88.0重量%)、抗坏血酸钠(10重量%)和碳酸氢钠(2.0重量%)的粉末混合物涂布第二基底的粘合剂,而不是用实施例1的粉末混合物进行涂布。

[0216] 实施例6. 实施例1-5的装置中的CO₂浓度测量

[0217] 使用具有用于CO₂张力测量的供应商提供的软件的pCO₂迷你v2光纤发送器(德国雷根斯堡的PreSens Precision Sensing股份有限公司(PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, DE), 目录号200001207), 针对CO₂生成, 对实施例1-5的自主产生厌氧环境的培养装置进行监测。通过抬起盖片打开每个装置暴露生长隔室的生长区域。将一毫升的无菌巴特菲尔德缓冲液沉积到每个平板的生长隔室中。将薄型CO₂传感器(直径5mm, 厚200微米)(Planar pCO₂Minisensor Spot, PreSens Precision Sensing股份有限公司, 目录号

200001178)立即放置到水合的生长隔室中并且将盖片缓慢放下,直到其接触水合的生长区域和间隔件。将平板塑料涂布器压在闭合的装置上,以使液体铺展在整个生长隔室中。在闭合装置之后,使用通向发送器的聚合物光纤缆线监测来自传感器的荧光。在闭合装置之后立即和在90分钟之后记录水合的生长隔室中的CO₂浓度的测量结果。在表2中,报道了在90分钟之后测量的CO₂浓度的平均倍数增加(n=5)。

[0218] 表2.

[0219]

培养装置	测量的CO ₂ 浓度的倍数增加
实施例1	3.9
实施例2	9.4
实施例3	5.5
实施例4	4.2
实施例5	9.2

[0220] 实施例7.自主产生厌氧环境的培养装置的制备和使用。

[0221] 构造根据图1的培养装置的自主产生厌氧环境的培养装置。根据实施例1所述的过程涂布和制备第一基底,唯一不同的是将瓜尔胶(14g/L)与表3的营养物质制剂配混,而不是表1中的制剂。

[0222] 将抗坏血酸钠(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Mo))和碳酸氢钠(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich Corporation))单独研磨,然后使其通过140目筛网(得到小于106微米的颗粒尺寸)。制备了瓜尔胶(89.7重量%,可购自丹麦哥本哈根的杜邦丹尼斯克公司(DuPont Danisco, Copenhagen, Denmark))、经筛分的抗坏血酸钠(10重量%)和经筛分的碳酸氢钠(0.3重量%)的均匀混合物。第二基底由透明的聚酯(PET)膜(0.073mm厚)组成,在所述膜的一侧上涂布有涂层重量为0.2g/24in²(1.3mg/cm²)的第二压敏粘合剂(与4%丙烯酰胺共聚的96重量%的丙烯酸异辛酯)。将痕量氯化三苯基四唑鎓(约0.48mg/24in²(0.003mg/cm²))掺入粘合剂中。然后将瓜尔胶、经筛分的抗坏血酸钠和经筛分的碳酸氢钠的均匀混合物粉末涂布到第二基底的粘合剂上。使用双面胶带将第二基底沿着一个边缘附接到第一基底,并将装置切割成与图1所示那些矩形相似的大约3英寸(7.6cm)×4英寸(10.1cm)的矩形。第二基底的经过涂布的那侧被取向成面向间隔件和生长隔室。

[0223] 作为来自食物样品的天然分离物获得细菌菌株乳杆菌属物种(*Lactobacillus* species)、肠系膜明串珠菌肠系膜亚种(*Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroides*)、肠系膜明串珠菌葡聚糖亚种(*Leuconostoc mesenteroides* ssp *dextranicum*)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbruekii*)、非解乳糖链球菌(*Streptococcus alactolyticus*)、格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)以及乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)的各个样品。在巴特菲尔德缓冲液中制备单独的悬浮液,并且将所述悬浮液连续稀释以获得浓度(各个生物体的)为提供约100个CFU计数的最终悬浮液。将每种悬浮液取1毫升用于接种根据该实施例制备的各个培养装置。通过以下步骤来接种培养装置:抬起盖片暴露生长隔室的生长区域,移取1毫升悬浮液到生长隔室中,轻轻放下盖片直到其与悬

浮液和间隔件接触,将平板塑料涂布器轻轻压到闭合的装置上,以将液体悬浮液铺展在整个生长隔室中。

[0224] 接种后,将培养装置在有氧温育箱中于32℃下温育48小时。温育后,通过目视检查对每个培养装置中的红色菌落进行计数。测定每种生物体的平均菌落计数($n=2$)。

[0225] 作为比较性参考,琼脂平板也接种与上文在此实施例的培养装置的情况下所使用的相同稀释度和体积的各悬浮液。使用乳杆菌MRS琼脂(新泽西州新富兰克林的BD公司(Becton Dickinson Corporation, New Franklin, NJ))制备琼脂平板。将琼脂(70g)依序悬浮在1L纯化水中;煮沸1分钟,溶解粉末;在121℃下高压灭菌15分钟;冷却至45-50℃。然后将冷却的培养基(每个培养皿15-20mL)倒入包含1mL的各样品悬浮液的无菌皮氏培养皿中。通过在一个方向上旋转平板,接着在相反方向上旋转平板,使接种物分布在整个培养基上。然后将已接种的培养皿与在温育期间提供厌氧气氛的产气袋(GASPAK EZ厌氧菌袋, BD公司)一起放置在厌氧室中。将琼脂平板在32℃下温育48小时。温育后,通过目视检查对平板上的菌落进行计数。测定每种生物体的平均菌落计数($n=2$)。

[0226] 在表4中,示出所测试的每种生物体的使用该实施例的培养装置测定的平均菌落计数相比于使用参考琼脂平板测定的平均菌落计数的比率[即,比率=(使用该实施例的培养装置的平均菌落计数)/(使用参考琼脂平板的平均菌落计数)]。

[0227] 表3. 用于涂布实施例7的装置的第一基底的营养物质粉末制剂。

[0228]

组分	量 (g/L)	来源
酪蛋白的酶消化	10	马里兰州巴尔的摩的 Alpha Biosciences 公司 (Alpha Biosciences, Baltimore, MD)
猪蛋白胨	10	马里兰州巴尔的摩的 Alpha Biosciences 公司 (Alpha Biosciences, Baltimore, MD)
酵母提取物	4	马里兰州巴尔的摩的 Alpha Biosciences 公司 (Alpha Biosciences, Baltimore, MD)
柠檬酸铵	1	宾夕法尼亚州森特瓦利的艾万拓公司(Avantor, Center Valley, PA)
醋酸钠	2.5	马萨诸塞州比尔里卡的 EMD 米利波尔 (EMD Millipore, Billerica, MA)
中性红染料	0.1	密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO)
结晶紫染料	0.002	密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO)
硫酸镁七水合物	0.2	宾夕法尼亚州森特瓦利的艾万拓公司(Avantor, Center Valley, PA)
硫酸锰一水合物	0.05	马萨诸塞州比尔里卡的 EMD 米利波尔 (EMD Millipore, Billerica, MA)
2-(N-吗啉代)乙磺酸	18.45	宾夕法尼亚州森特瓦利的艾万拓公司(Avantor, Center Valley, PA)
2-(N-吗啉代)乙磺酸钠 盐	12.04	美国俄亥俄州索伦的 Amresco 公司 (Amresco, Solon, OH)
葡萄糖	20	加利福尼亚州圣玛丽亚的 Hardy Diagnostics 公 司(Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA)
麦芽糖	20	美国俄亥俄州索伦的 Amresco 公司 (Amresco, Solon, OH)
聚氧乙烯山梨糖醇单油 酸酯	1.08	美国俄亥俄州索伦的 Amresco 公司 (Amresco, Solon, OH)
两性霉素 B	0.02	密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO)

[0229] 表4. 实施例7的细菌菌株的菌落计数比率[比率 = (使用实施例7的培养装置的平均菌落计数) / (使用参考琼脂平板的平均菌落)]

[0230]		比率
	乳杆菌属物种	0.95
	肠系膜明串珠菌肠系膜亚种	1.04
	肠系膜明串珠菌葡聚糖亚种	0.88
	短乳杆菌	1.31
	植物乳杆菌	1.01
	德氏乳杆菌	1.11
	非解乳糖链球菌(<i>Streptococcus alactolyticus</i>)	1.24
	格氏乳球菌	0.85
	乳酸片球菌	0.99

[0231] 实施例8.自主产生厌氧环境的培养装置的制备。

[0232] 构造根据图1的培养装置的自主产生厌氧环境的培养装置。基部由4密耳(0.102mm)厚的聚酯膜(MELINEX等级377,双轴向取向的聚酯(PET)膜,购自杜邦帝人公司(DuPont Teijin))组成。经由压敏粘合剂(与2重量%的丙烯酸共聚的98重量%的丙烯酸异辛酯)的薄层将聚苯乙烯泡沫间隔构件(大约0.38mm厚且具有大约19.3kg/m³的密度)附着至第一基底。间隔构件包含直径为23/8英寸(6.03cm)的圆形开口,所述开口限定装置的生长隔室的周边。

[0233] 将硫酸亚铁(II)七水合物(FeSO₄·7H₂O)(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich Corporation))研磨,并且使其通过140目筛网(得到小于106微米的颗粒尺寸)。制备了瓜尔胶(70g,购自杜邦丹尼斯克公司(DuPont Danisco))和经筛分的FeSO₄·7H₂O(1g)的均匀混合物。盖片由透明的聚酯(PET)膜[2.9密耳(0.074mm厚)]组成,在所述膜的一侧上涂布有涂层重量为0.2g/24in²(1.3mg/cm²)的第二压敏粘合剂(与4%丙烯酰胺共聚的96重量%的丙烯酸异辛酯)。将瓜尔胶和经筛分的FeSO₄·7H₂O的均匀混合物粉末涂布到盖片的粘合剂上。使用双面胶带将盖片沿着一个边缘附接到基部,并将装置切割成与图1所示那些矩形相似的大约3英寸(7.6cm)×4英寸(10.1cm)的矩形。盖片的经过涂布的那侧被取向成面向间隔件和生长隔室。

[0234] 实施例9.自主产生厌氧环境的培养装置的制备。

[0235] 使用如实施例8所述的程序构建自主产生厌氧环境的培养装置,不同的是用瓜尔胶(70g)、L-半胱氨酸(0.5g,购自西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich Corporation))和硫代乙醇酸钠(2g,购自西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich Corporation))的粉末混合物涂布盖片的粘合剂,而不是用实施例8的粉末混合物进行涂布。

[0236] 实施例10.自主产生厌氧环境的培养装置的制备。

[0237] 使用如实施例8所述的程序构建自主产生厌氧环境的培养装置,不同的是用瓜尔胶(70g)、经筛分的FeSO₄·7H₂O(1g)和亚硫酸钠(0.5g,购自西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich Corporation))的粉末混合物涂布盖片的粘合剂,而不是用实施例8的粉末混合物进行涂布。

[0238] 实施例11.实施例9-10的自主产生厌氧环境的培养装置用于培养生孢梭菌的用途。

[0239] 将生孢梭菌ATCC 3584 (在水中储存于4℃) 用巴特菲尔德缓冲液连续稀释(10倍稀释) 至约100CFU/mL的浓度,接着在改良的脑心浸液液体培养基中进一步稀释(10倍) 以提供接种样品。改良的脑心浸液含水液体培养基由表5中列出的制剂制备。向接种样品中加入氯化三苯基四唑(20μg/mL)。向根据实施例8和实施例9制备的各个培养装置接种1mL的接种样品。通过以下步骤来接种培养装置:抬起盖片暴露生长隔室,移取1毫升悬浮液到生长隔室中,轻轻放下盖片直到其与悬浮液和间隔构件接触,并且将平板塑料涂布器轻轻压到闭合的装置上,以将接种样品铺展在整个生长隔室中。

[0240] 接种后,将培养装置在有氧环境中于30℃下温育72小时。温育后,通过目视检查对具有相结合的气泡的红色菌落进行计数。菌落计数结果报告于表6中。

[0241] 作为比较性参考,按照制造商的说明书利用1mL的已经仅用巴特菲尔德缓冲液作为稀释剂连续稀释的接种样品对3M PETRIFILM有氧计数板(明尼苏达州梅普尔伍德的3M公司(3M Corporation,Maplewood,MN))进行接种。然后将板在厌氧腔室(英国约克郡的DWS公司(Don Whitley Scientific Ltd.,Yorkshire,UK))中于37℃下温育72小时。温育后,通过目视检查对具有相结合的气泡的红色菌落进行计数。菌落计数结果报告于表6中。

[0242] 表5.

[0243]

组分	量 (g/L)	来源
脑心浸液	37	美国新泽西州新富兰克林的碧迪公司 (Becton Dickinson Corp, New Franklin, NJ)
酵母提取物(BACTO)	5	美国新泽西州新富兰克林的碧迪公司 (Becton Dickinson Corp, New Franklin, NJ)
L-半胱氨酸	0.5	密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO)

[0244] 实施例12. 实施例10的自主产生厌氧环境的培养装置用于培养生孢梭菌的用途。

[0245] 使用与实施例11中所述相同的接种和温育条件,不同的是不向接种样品中加入氯化三苯基四唑。对具有黑色沉淀和相结合的气泡的灰黑色菌落计数。结果报告于表6中。

[0246] 表6.

[0247]

培养装置	菌落数量
实施例8	57
实施例9	73
实施例10	53
PETRIFILM AC板(比较性参考)	61

[0248] 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一个或多个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。前述详细说明和示例仅为了清楚地理解本发明而给出。它们不应被理解为不必要的限制。本发明不限于示出的和描述的具体细节,对本领域的技术人员而言显而易见的变型形式将包括在由权利

要求书所限定的本发明范围内。

[0249] 所有的标题是为了阅读者方便,而不应该用于限制该标题后面的正文的含义,除非如此规定。

[0250] 在不脱离本发明的实质和范围的前提下,可进行各种修改。这些以及其它实施方案均在如下权利要求书的范围内。

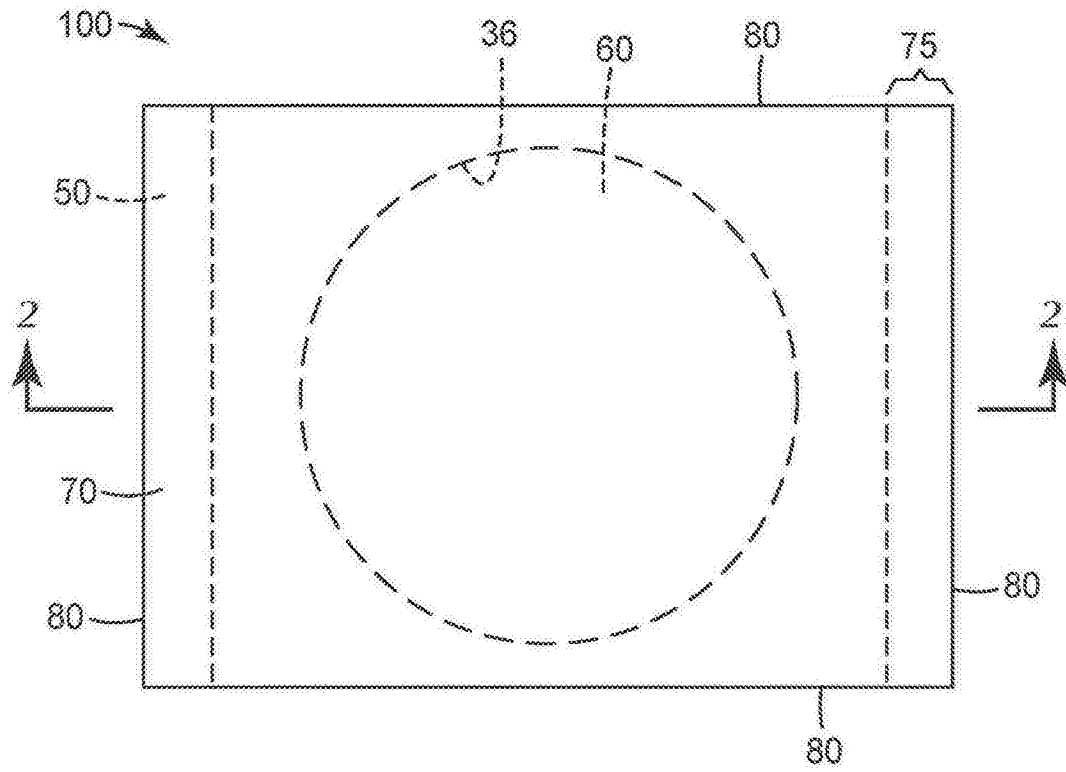


图1

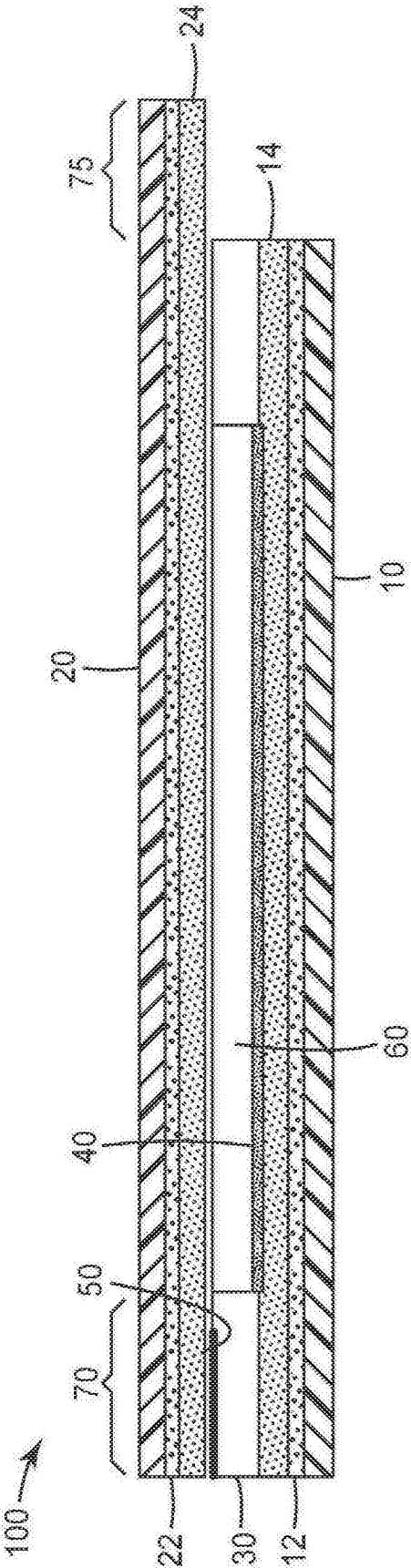


图2

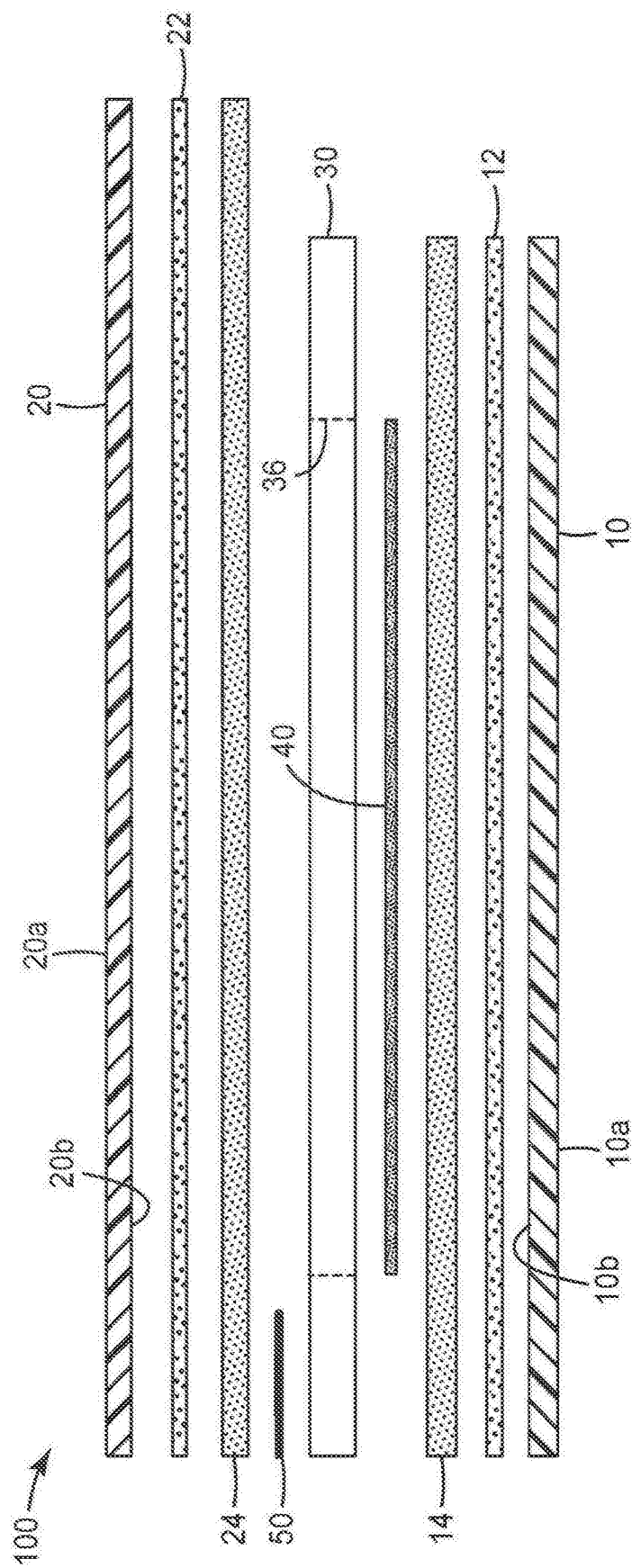


图3