

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

G01N 21 / 67

G01N 21 / 69

[21] 申请号 96105260.0

[43]公开日 1997年5月21日

[11] 公开号 CN 1150246A

[22]申请日 96.5.28

[30]优先权

[32]95.10.18 [33]EP [31]19538768.6

[71]申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101北京市朝阳区大屯路15号

[72]发明人 张锦珠

沸资-艾伯特波普

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图页数 4 页

[54]发明名称 一种用电发光快速检验微生物污染的灵敏方法及其用途

[57]摘要

本发明涉及一种检验液体中微生物污染方法，特别是用电发光检验饮料、牛奶、酒、水、医药等液体中微生物的方法。本发明为了适应工业生产的需要，可以直接用在被检物的生产线上，边生产边检验，既提高了工作效率又保证产品质量，从而提供一种加电压于插入被测样品中的一对电极上，边加电压边用单光子探测器测量对照样品和被检样品的电发光强度随时间的变化，根据发光强度的平均值的差别得出样品被污染情况，该方法简单、快速，灵敏度高达100个细菌/ml。

权 利 要 求 书

1. 一种用电发光快速检验微生物污染的灵敏方法, 其特征在于: 包括把被检样品分成二份, 一份经物理方法处理做成无污染的对照样品, 另一份做成含不同微生物浓度的被检样品, 分别把这些样品倒入清洁干净的测量容器4内, 并在被测样品3中插入一对金属的丝状或平板形电极1、2, 两电极1、2之间距离为1—30 mm, 然后分别把整个测量容器放在单光子探测仪5的暗室内, 进行测量光子发射, 把电源发生器6与电极1、2相联, 在电极1、2上施加5—100 V电压, 每次通电0.1秒—10秒钟后断电, 通电时用单光子探测仪测得样品的电发光强度, 通过对被检样品和对照样品的电发光强度、再通过对测得的电发光强度与时间积分, 计算出它们的平均发光强度进行比较, 得到被检样品被微生物污染的程度。

2. 按权利要求1所述的用电发光快速检验微生物污染的灵敏方法, 其特征在于: 所述的电极1、2是用铜、锌、钼、铂、钛、银、铬、镉、不锈钢等金属材料做成 $\phi 0.2-1.0\text{mm}\times 5-20\text{mm}$ 长的丝状电极, 或做成面积为 $1\text{mm}^2-1\text{cm}^2$ 的平板形电极。

3. 按权利要求1所述的用电发光快速检验微生物污染的灵敏方法, 其特征在于: 所述的对照样品经过物理方法处理做成的是采用加热消毒, 或微孔滤膜过滤。

4. 按权利要求1所述的用电发光快速检验微生物污染的灵敏方法, 其特征在于: 所述的不同微生物浓度的被检样品是取不同体积的对照样品稀释被检样品做成的。

5. 一种用电发光快速检验微生物污染的灵敏方法的用途, 其特征在于: 用于检测饮料、啤酒、牛奶、调料、食品、制药的生产行业 and 水的监测行业上; 也可以直接与生产线相接, 边生产边检验。

说明书

一种用电发光快速检验微生物污染的灵敏方法及其用途

本发明涉及一种检验液体中微生物污染的技术领域，特别是利用电发光检验饮料、牛奶、水、酒等或把被检验固体配成液体检验它们当中微生物污染的技术方法。

目前常用的检验物质中是否被微生物污染采用培养方法，即克隆方法，如检验啤酒在生产过程中是否被细菌污染了，牛奶在灌装过程中是否被细菌污染等等，克隆方法如文献1。

Koch, A.: Growth Measurement in Manual of methods for general bacteriology, ed by Gerhardt, Murray, Costilow, Nester, Wool, Krieg and Phillips American Society for Microbiology, 1981 p179-206. 该方法是一种培养方法。首先要把被检验的样品作成不同稀释样品后加入培养基中，放在适当温度的培养箱内培养，一般培养温度在37℃，培养时间除个别的物质可几个小时，一般需经24-48小时之后才可把被检样品中的微生物或细菌培养出来。然后再用目测观察培养物细菌的克隆数目，观察它的多少决定污染情况，如果看不到克隆就认为没有细菌污染，整个过程需在无菌条件下进行。这个方法由于培养时间长，造成检验一次周期长的缺点，往往在食品工业如啤酒生产过程中是不允许的，这么长的培养时间而影响了啤酒的质量，造成经济损失，第二个缺点该方法准确性不高，不够灵敏，因为该方法要求被检样品中微生物得达到一定多的程度才可以看得出来，所以在污染情况比较轻微时一般培养出细菌克隆观察不到而误诊。

还有另外一种荧光免疫方法，如文献 2. Wolff, L. F., Anderson, L., Sandberg, G. P., Reither, L., Binsfeld, C. A., Corinaldesi, G., Shelburne, C.E. Bacteria concentration fluorescence immunoassay (BCFIA) for the detection of periodontopathogens in plaque. J. Periodontol. 1992, 63. 1093-101. 所述的：它已在某些医药卫生领域中应用。该方法把被检物通过培养它的免疫荧光抗体，如果检测物中有微生物它就与培养出的免疫荧光抗体产生荧光，通过荧光分光光度计测量，就可以观察到荧光强度判断样品被污染的情况。该方法的优点是快速，但是检验过程复杂，设备昂贵，不可能普遍推广。另外的缺点只限于特定的细菌，即只适用于免疫荧光的细菌有效，因而该方法有局限性。

本发明的目的是为了克服上述已有技术的缺点和不足，为了适应工业生产的需要，可直接用在啤酒、饮料、牛奶、制药生产线上和水的监测中，边生产边检验提高生产效率和保证产品的质量。从而提供一种加电压于盛有被测液体样品的测量容器内的一对电极上，通电几秒钟后断电，并且边加电压边利用单光子探测仪测量被检样品和标准样品的电发光强度随时间的变化，根据发光强度的差别得出该被检样品是否被微生物污染及污染的程度。

该方法可用于饮料生产、啤酒、牛奶、调料、食品、制药、水的监测等凡是需要检验微生物污染的行业。

本发明的目的是这样完成的：

该方法的第一步把电极准备好，常用的电极由铜、锌、钼、铂、钛、银、铬、镉、不锈钢等金属材料做成丝状、螺旋状、

平板形电极，一般丝状电极直径为0.2—1.0 mm，其长度为5—20 mm；平板状电极面积可变，一般为1mm²—1 cm²；电极使用前需彻底清洗干净，以防不干净带给被测样品污染。

第二步准备标准样品和被检样品。

首先将被检样品分成二份，（如果是固体样品需配成液体样品，因为该方法只适于测液体样品），一份做为对照样品，一份做为被检样品。对照样品是用被检样品经过加热消毒、或微孔滤膜过滤等方法把被测样品中的微生物去除干净做成的，然后备用；另一份被检样品用做好的标准样品稀释而成，可将被检样品稀释为二种以上含微生物不同浓度的样品，分别备用。

第三步测量。

取清洗干净的无菌测量容器，测量容器可以用石英、玻璃等透明绝缘材料做成。将已配好的标准样品和不同浓度的被检样品分别倒入测量容器内，再插入一对电极，两电极之间距离为1—30 mm，把测量容器放在单光子探测仪的暗室内，把电源发生器与两电极相联，然后接通电源施电压5—100 V在电极上，通电时间为0.1秒—10秒后断电，可多次重复，并在加电压的过程中用单光子探测仪测量被检和标准样品的电发光强度进行比较，可以判断是否有细菌污染，再进一步用被检样品的发光强度随时间的变化与标准样品比较，通过计算发光强度对时间的积分，求平均值来比较，从平均值得到被检样品的污染程度。

优点：

本发明的方法简单，不需通过微生物培养，只需对被检样品内的电极通电产生光子，并且用单光子检测仪来测量光子发

射，因此该方法快速。第三个优点是灵敏度高，可达100个细菌/ml，因此该方法用途广，可用于水源污染的监督，饮料工业、啤酒工业、牛乳工业、食品工业和医药工业等，该方法可以直接联接在生产线上。

下面结合附图及实施例对本发明进行详细地说明：

图1是本方法所用测量装置示意图。

图2是本方法用在啤酒等工业生产线中的示意图。

图3是本方法中所采用的一种平板电极示意图。

图4是一种饮料的对照样品电发光强度与时间的关系曲线。

图5是该种饮料被检样品（含细菌浓度为100个/ml）的电发光强度与时间的关系曲线。

图面说明：

- | | |
|-----------|----------|
| 1— 电极 | 2— 电极 |
| 3— 被测样品 | 4— 测量容器 |
| 5— 单光子探测仪 | 6— 电源发生器 |
| 7— 液体进口 | 8— 液体出口 |

实施例1：利用本发明的方法测量一种饮料中的细菌。该饮料事先加入细菌，浓度为100个细菌/ml。

采用图1的测量装置，电极1、2为 $\phi 0.2$ mm细丝，先用强碱溶液将电极洗干净，再用蒸馏水冲洗。取石英测量容器严格清洗干净，把被检饮料分别倒入两个石英杯中，先把一杯饮料用微孔滤膜过滤做对照样品，取另一石英杯中饮料做为被检样品。分别在测量杯内插入一对电极，其电极间距为5 mm。在一电极上施加30 V电压5秒断电，共重复三次，并在加压过程中

用单光子探测仪（欧州专利 EP0430150 号专利生产的，该仪器测量波范围在 200 nm 到 800 nm，灵敏度为 $10^{-17}W$ ），测量发光强度如图 4、5 所示，再对测得的电发光强度与时间积分计算出平均值，其结果如下列所示：

细菌数 (个 / ml)	平均电发光强度 (光子 / 100 ms)。
0	75.5 ± 7.5
100	54.8 ± 10.1

实施例 2：利用本发明的方法检测啤酒被细菌污染的程度。

如图 1 所示，10 ml 啤酒放入测量杯中，将铂电极丝 ($\phi 0.5\text{mm}$) 插入被测啤酒中，将测量杯装入测量暗室中，测光子发射强度，加电压 50 V，5 秒钟去掉电压，20 秒后重复一次，共重复三次，求发光强度平均值，如表 2 给出：

细菌数 (个 / ml)	平均发光强度 (光子 / 100 ms)
0	2850 ± 101.9
100	2192 ± 118.0

实施例 3：利用本发明的方法检测水中细菌程度。

如图 1 所示，将 10 ml 蒸馏水装入测量杯中，插入银电极 ($\phi 0.5\text{ mm}$)，将测量杯装入测量暗室中，测光子发射强度，加电压 30 V，5 秒钟去掉电压，20 秒后重复一次，共重复三次，求发光强度平均值，如表 3 给出：

细菌数 (个/ml)	平均发光强度 (光子/100 ms)
0	14.1 ± 2.5
100	9.3 ± 1.6

实施例4：利用本发明的方法检测自来水中细菌污染程度。

如图2所示，在容器4内充入自来水，采用不锈钢电极，加电压80 V，3秒钟去掉电压，重复二次，求发光强度平均值，如表4给出：

细菌数 (个/ml)	平均发光强度 (光子/1 ms)
0	125.6 ± 26.8
100	80.7 ± 13.3

实施例5：利用本发明的方法检测啤酒被细菌污染的程度。

如图3所示，将一种啤酒装入测量杯中，装入厚0.1 mm钛片电极，将测量杯放进测量暗室，加电压3V，2秒钟去掉电压，重复二次，测发光强度平均值，如表5给出：

细菌数 (个/ml)	平均发光强度 (光子/1 ms)
0	213.4 ± 21.6
100	158.6 ± 18.2

说明书附图

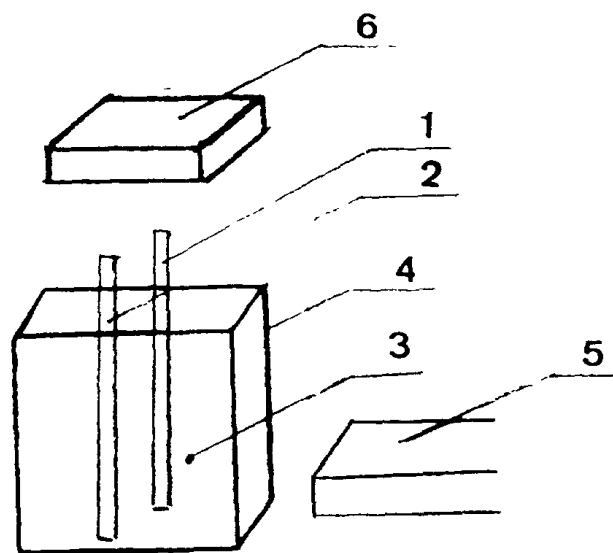


图1

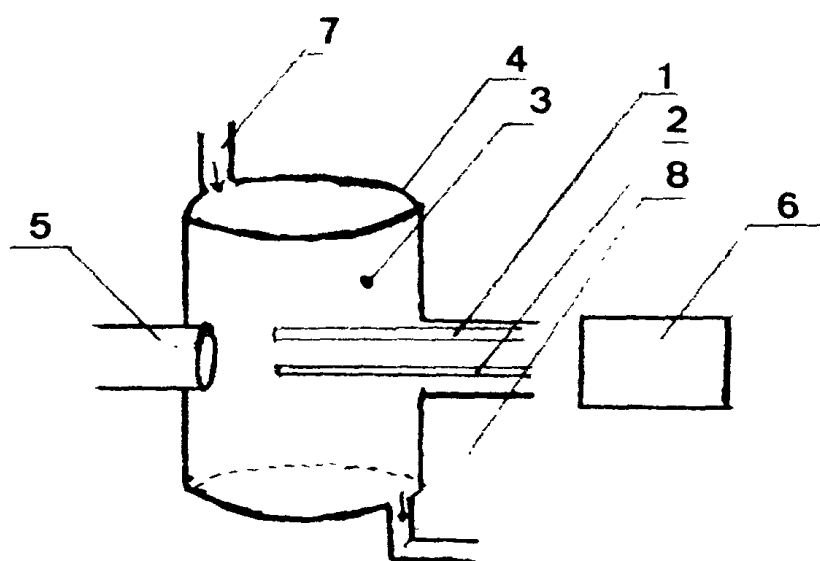


图2

说明书附图

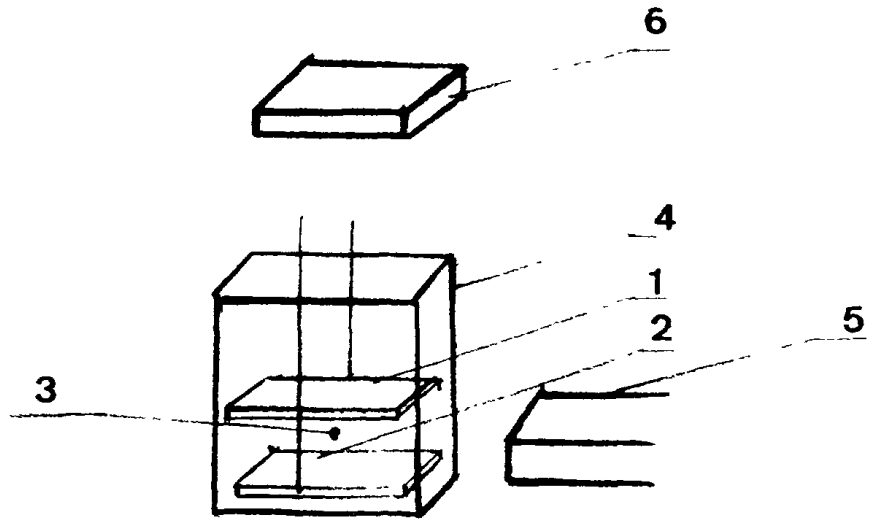


图3

说明书附图

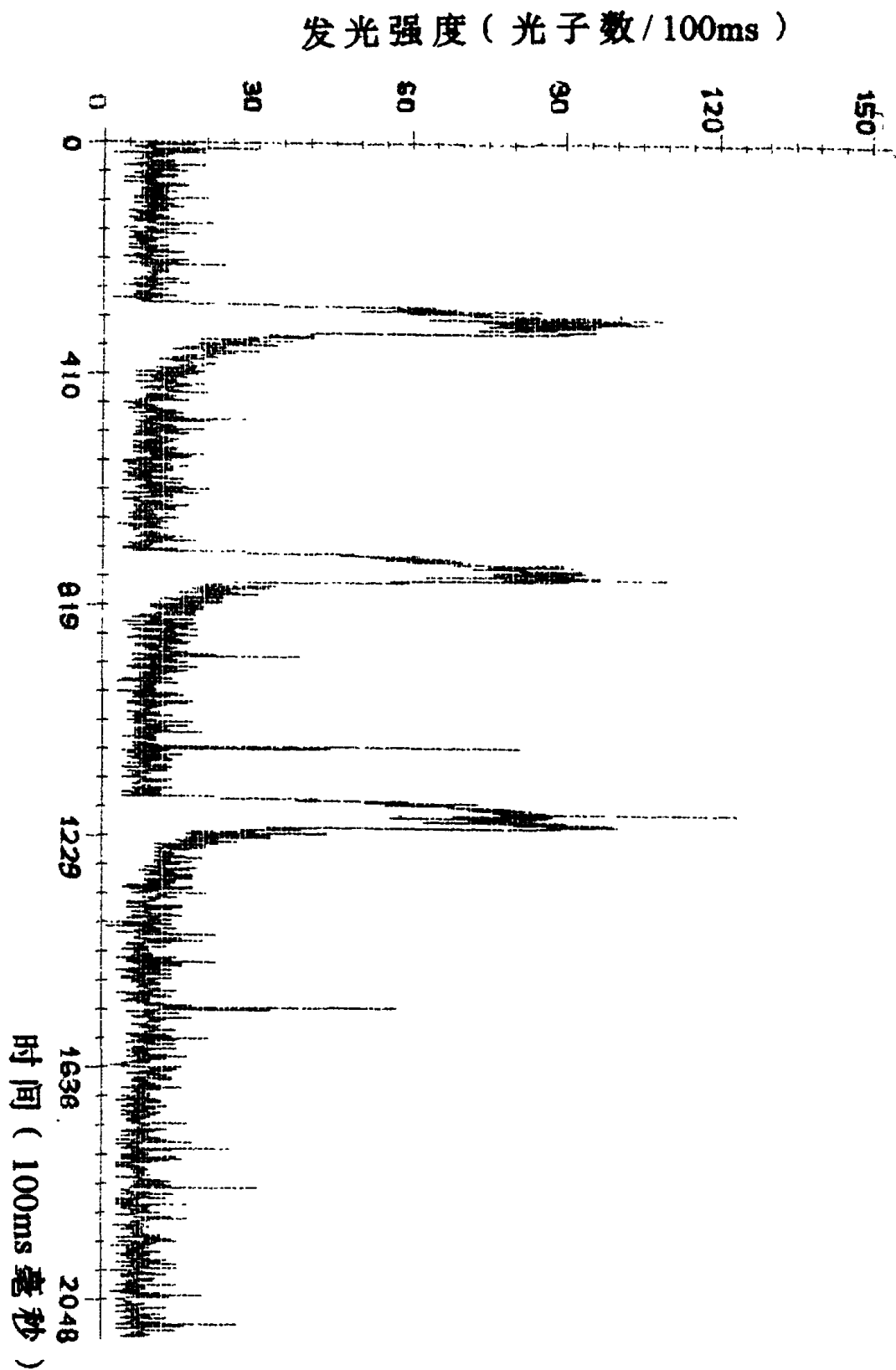


图 4

说明书附图

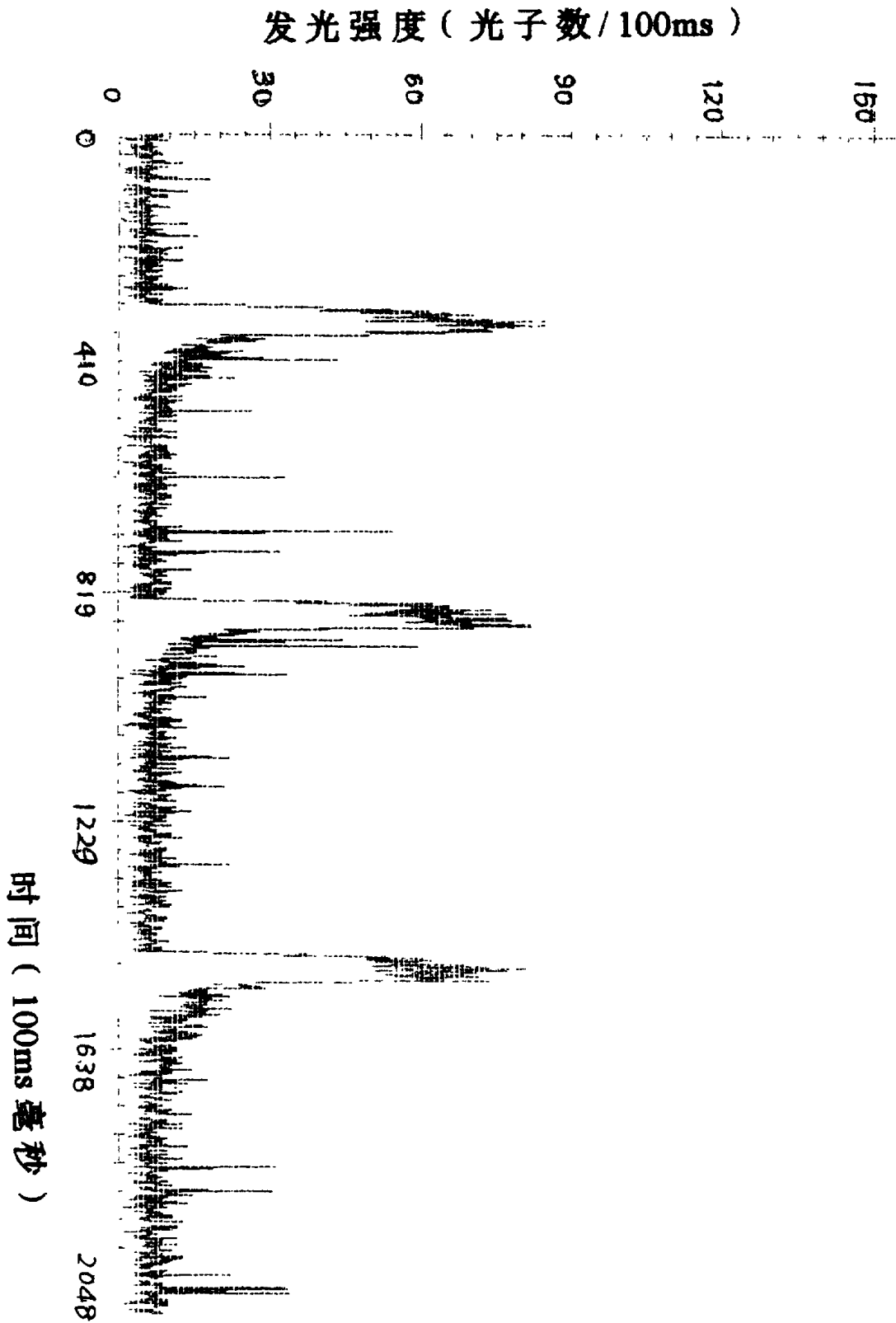


图 5