

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2025 年 1 月 16 日 (16.01.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/010976 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 1/00 (2006.01) **C12Q 1/04** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/071193

(22) 国际申请日: 2024 年 1 月 8 日 (08.01.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202310859409.8 2023年7月13日 (13.07.2023) CN

(71) 申请人: 中国石油化工天然气股份有限公司 (**PETROCHINA COMPANY LIMITED**) [CN/CN];
中国北京市东城区东直门北大街 9 号, Beijing 100007 (CN)。

(72) 发明人: 王彦然(**WANG, Yanran**); 中国北京市东城区东直门北大街9号, Beijing 100007 (CN)。 刘海峰(**LIU, Haifeng**); 中国北京市东城区东直门北大街 9 号, Beijing 100007 (CN)。 余华利(**YU, Huali**); 中国北京市东城区东直门北大街9号, Beijing 100007 (CN)。 唐永帆(**TANG, Yongfan**); 中国北京市东城区东直门北大街9号, Beijing 100007 (CN)。 闫静(**YAN, Jing**); 中国北京市东城区东直门北大街 9 号, Beijing 100007 (CN)。 王智(**WANG, Zhi**); 中国北京市东城区东直门北大街9号, Beijing 100007 (CN)。 彭林彩(**PENG, Lincai**); 中国北京市东城区东直门北大街9号, Beijing 100007 (CN)。

(74) 代理人: 北京润平知识产权代理有限公司 (**RUNPING & PARTNERS**); 中国北京市海淀区北四环西路9号银谷大厦515室, Beijing 100190 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) **Title:** SULFATE REDUCING BACTERIA CULTURE MEDIUM AND USE THEREOF IN CULTURE AND DETECTION OF SULFATE REDUCING BACTERIA, AND METHOD FOR DETECTING SULFATE REDUCING BACTERIA

(54) 发明名称: 硫酸盐还原菌培养基及其在硫酸盐还原菌的培养和检测中的用途和硫酸盐还原菌的检测方法

(57) **Abstract:** A sulfate reducing bacteria culture medium and a use thereof in culture and detection of sulfate reducing bacteria, and a method for detecting sulfate reducing bacteria. The culture medium comprises an electron mediator and L-cysteine; and on the basis of the total volume of the culture medium, in the culture medium, the content of the electron mediator is 10-100 mg/L, and the content of the L-cysteine is 1-20 mg/L, wherein the electron mediator is selected from riboflavin and/or flavin adenine dinucleotide. The culture medium provided by the present invention can significantly shorten the culture time required for strain purification and concentration measurement, and can significantly improve the detection efficiency.

(57) 摘要: 硫酸盐还原菌培养基及其在硫酸盐还原菌的培养和检测中的用途和硫酸盐还原菌的检测方法。所述培养基包含电子中介物和L-半胱氨酸; 以所述培养基的总体积为基准, 所述培养基中, 所述电子中介物的含量为10-100mg/L, L-半胱氨酸的含量为1-20mg/L; 其中, 所述电子中介物选自核黄素和/或黄素腺嘌呤二核苷酸。本发明提供的培养基能够显著缩短菌种纯化和浓度检测所需的培养时间, 能够显著提升检测效率。

WO 2025/010976 A1

硫酸盐还原菌培养基及其在硫酸盐还原菌的培养和检测中的用途和 硫酸盐还原菌的检测方法

相关申请的交叉引用

本申请要求 2023 年 07 月 13 日提交的中国专利申请 202310859409.8 的权益，该申请的内容通过引用被合并于本文。

技术领域

本发明涉及气田水样检测领域，具体涉及电子中介物和 L-半胱氨酸的组合在促进硫酸盐还原菌生长中的用途、一种硫酸盐还原菌培养基及其在硫酸盐还原菌的培养和检测中的用途和硫酸盐还原菌的检测方法。

背景技术

非常规气开采过程中普遍存在硫酸盐还原菌（SRB）代谢造成的腐蚀问题，导致地面集气管线甚至井下油管穿孔失效，严重制约气田安全上产。对此，有必要针对非常规气介质工况，持续开展有关 SRB 的研究和检测。

培养基是研究细菌生长代谢、富集提纯和检测细菌浓度的常用介质，国内外目前常见的培养基虽然能够有效完成细菌的生长、富集和检测，但是，形成稳定数目的菌落所需的培养时间往往达到 3-5 天以上，导致实验周期较长，细菌检测的效率低下，关于 SRB 方面的研究和支撑工作难以高效开展。因此，有必要创新形成能够促进 SRB 菌落快速生长的培养基，缩短形成稳定菌落的生长时间，实现 SRB 的快速提纯和检测。当前，虽然已形成了多种类型的培养基，例如 CN102329851A 和 CN113881594A 公布了两类 SRB 培养基，但并未

有效缩短 SRB 生长繁殖形成稳定菌落所需的时间。因此，国内外的实验研究和细菌检测都亟需能够进一步缩短 SRB 培养时间，促进 SRB 快速生长繁殖的培养基，以提高室内科研实验和工业现场细菌检测效率。

发明内容

本发明的目的是为了克服现有技术存在的硫酸盐还原菌培养基培养硫酸盐还原菌时，硫酸盐还原菌菌落生长较慢，形成稳定菌落的生长时间较长，导致细菌检测效率低下的问题，提供电子中介物和 L-半胱氨酸的混合物在促进硫酸盐还原菌生长中的用途、一种硫酸盐还原菌培养基及其在硫酸盐还原菌的培养和检测中的用途，该培养基能够使硫酸盐还原菌菌落快速生长，有效缩短硫酸盐还原菌纯化和浓度检测所需的培养时间，能够显著提升检测效率。

为了实现上述目的，本发明第一方面提供电子中介物和 L-半胱氨酸的组合在促进硫酸盐还原菌生长中的用途，当培养基中所述电子中介物的含量为 10-100mg/L，L-半胱氨酸的含量为 1-20mg/L 时，硫酸盐还原菌在所述培养基形成稳定菌落数目的时间在 24-44h，优选为 30-35h；其中，所述电子中介物选自核黄素和/或黄素腺嘌呤二核苷酸。

本发明第二方面提供一种硫酸盐还原菌培养基，所述培养基包含电子中介物和 L-半胱氨酸；以所述培养基的总体积为基准，所述培养基中，所述电子中介物的含量为 10-100mg/L，L-半胱氨酸的含量为 1-20mg/L；其中，所述电子中介物选自核黄素和/或黄素腺嘌呤二核苷酸。

本发明第三方面提供一种本发明提供的培养基在硫酸盐还原菌的培养和检测中的用途。

本发明第四方面提供一种硫酸盐还原菌的检测方法，所述方法包

括：将硫酸盐还原菌在本发明提供的培养基进行培养，当硫酸盐还原菌在所述培养基形成稳定菌落数目时，读取菌落数目，从而得到待测样中硫酸盐还原菌的浓度。

通过上述技术方案，本发明的有益效果为：

本发明通过在培养基组分中加入一定量的电子中介物（核黄素和/或黄素腺嘌呤二核苷酸）及 L-半胱氨酸，二者协同作用能够促进 SRB 的生长和繁殖过程，缩短菌落的形成时间，本发明提供的培养基能够显著缩短菌种纯化和浓度检测所需的培养时间，将利用培养基进行菌种纯化和浓度检测所需的培养时间缩短到 44h 以内，显著提升了实验和检测效率。

本发明充分考虑 SRB 细胞生长代谢过程中所需的碳源、氮源、磷源和无机盐等各类营养物质，配方组分类型较其它培养基更加丰富完善，并且规定将各组分的浓度及配比控制在适宜 SRB 生长的范围内，更大程度地提供 SRB 适宜的生长环境，促进 SRB 快速生长代谢。

与其它类型的细菌检测方法比较，因检测方法是基于细菌在本发明提供的培养基中生长培养形成的，所以用途本发明提供的培养基开展检测，检测周期短，能够充分排除死细胞数目的干扰，可广泛用于加注杀菌缓蚀剂前后的水样检测，也不需要依靠精密设备读数，能够充分满足快速、准确、下限低和简便的现场需求。

具体实施方式

在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值，这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说，各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间，以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围，这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

本发明第一方面提供电子中介物和 L-半胱氨酸的组合在促进硫酸盐还原菌生长中的用途，当培养基中所述电子中介物的含量为 10-100mg/L(例如可以为 10mg/L、11mg/L、12mg/L、13mg/L、14mg/L、15mg/L、16mg/L、17mg/L、18mg/L、19mg/L、20mg/L、21mg/L、22mg/L、23mg/L、24mg/L、25mg/L、26mg/L、27mg/L、28mg/L、29mg/L、30mg/L、31mg/L、32mg/L、33mg/L、34mg/L、35mg/L、36mg/L、37mg/L、38mg/L、39mg/L、40mg/L、41mg/L、42mg/L、43mg/L、44mg/L、45mg/L、46mg/L、47mg/L、48mg/L、49mg/L、50mg/L、51mg/L、52mg/L、53mg/L、54mg/L、55mg/L、56mg/L、57mg/L、58mg/L、59mg/L、60mg/L、65mg/L、70mg/L、75mg/L、80mg/L、85mg/L、90mg/L、95mg/L 和 100mg/L 以及任意两个值之间组成的任意范围)，L-半胱氨酸的含量为 1-20mg/L(例如可以为 1mg/L、2mg/L、3mg/L、4mg/L、5mg/L、6mg/L、7mg/L、8mg/L、9mg/L、10mg/L、11mg/L、12mg/L、13mg/L、14mg/L、15mg/L、16mg/L、17mg/L、18mg/L、19mg/L 和 20mg/L 以及任意两个值之间组成的任意范围) 时，硫酸盐还原菌在所述培养基形成稳定菌落数目的时间在 24-44h(例如可以为 24h、25h、26h、27h、28h、29h、30h、31h、32h、33h、34h、35h、36h、37h、38h、39h、40h、41h、42h、43h 和 44h 以及任意两个值之间组成的任意范围)，优选为 30-35h；其中，

所述电子中介物选自核黄素和/或黄素腺嘌呤二核苷酸。

本发明中，发明人对多株硫酸盐还原菌进行了测试，电子中介物和 L-半胱氨酸的组合对促进各硫酸盐还原菌株生长的效果接近。

本发明第二方面提供一种硫酸盐还原菌培养基，所述培养基包含电子中介物和 L-半胱氨酸；以所述培养基的总体积为基准，所述培养基中，所述电子中介物的含量为 10-100mg/L，例如可以为 10mg/L、

11mg/L、12mg/L、13mg/L、14mg/L、15mg/L、16mg/L、17mg/L、18mg/L、19mg/L、20mg/L、21mg/L、22mg/L、23mg/L、24mg/L、25mg/L、26mg/L、27mg/L、28mg/L、29mg/L、30mg/L、31mg/L、32mg/L、33mg/L、34mg/L、35mg/L、36mg/L、37mg/L、38mg/L、39mg/L、40mg/L、41mg/L、42mg/L、43mg/L、44mg/L、45mg/L、46mg/L、47mg/L、48mg/L、49mg/L、50mg/L、51mg/L、52mg/L、53mg/L、54mg/L、55mg/L、56mg/L、57mg/L、58mg/L、59mg/L、60mg/L、65mg/L、70mg/L、75mg/L、80mg/L、85mg/L、90mg/L、95mg/L 和 100mg/L 以及任意两个值之间组成的任意范围，L-半胱氨酸的含量为 1-20mg/L，例如可以为 1mg/L、2mg/L、3mg/L、4mg/L、5mg/L、6mg/L、7mg/L、8mg/L、9mg/L、10mg/L、11mg/L、12mg/L、13mg/L、14mg/L、15mg/L、16mg/L、17mg/L、18mg/L、19mg/L 和 20mg/L 以及任意两个值之间组成的任意范围；其中，所述电子中介物选自核黄素和/或黄素腺嘌呤二核苷酸。

通过在培养基组分中加入一定量的电子中介物（核黄素和/或黄素腺嘌呤二核苷酸）及 L-半胱氨酸，二者协同作用能够促进 SRB 的生长和繁殖过程，缩短菌落的形成时间，本发明提供的培养基能够显著缩短菌种纯化和浓度检测所需的培养时间，显著提升了实验和检测效率。

根据本发明，优选地，所述培养基还包含碳源、氮源、磷源和无机盐。

本发明对碳源的种类没有特别限制，为了更好地吸收营养，优选地，所述碳源选自乳酸钠和/或葡萄糖，更优选为乳酸钠。

本发明对氮源的种类没有特别限制，为了更好地吸收营养，优选地，所述氮源选自酵母粉和/或胰蛋白胨，更优选为胰蛋白胨。

根据本发明，优选地，所述磷源选自 KH_2PO_4 和/或 K_2HPO_4 ，优选为 KH_2PO_4 。

根据本发明，优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基中，所述电子中介物的含量为 35-45mg/L，L-半胱氨酸的含量为 5-10mg/L。

根据本发明，优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基中，所述碳源的含量为 7-15g/L，例如可以为 7g/L、7.5g/L、8g/L、8.5g/L、9g/L、9.5g/L、10g/L、10.5g/L、11g/L、11.5g/L、12g/L、12.5g/L、13g/L、13.5g/L、14g/L、14.5g/L 和 15g/L 以及任意两个值之间组成的任意范围，优选为 8-10g/L。

根据本发明，优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基中，所述氮源的含量为 0.5-1.7g/L，例如可以为 0.5g/L、0.6g/L、0.7g/L、0.8g/L、0.9g/L、1g/L、1.1g/L、1.2g/L、1.3g/L、1.4g/L、1.5g/L、1.6g/L 和 1.7g/L 以及任意两个值之间组成的任意范围，优选为 0.8-1g/L。

根据本发明，优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基中，所述磷源的含量为 0.1-0.5g/L，例如可以为 0.1g/L、0.15g/L、0.2g/L、0.25g/L、0.3g/L、0.35g/L、0.4g/L、0.45g/L 和 0.5g/L 以及任意两个值之间组成的任意范围，优选为 0.2-0.4g/L。

本发明对培养基中碳源、氮源和磷源的重量比没有特别限制，为了使硫酸盐还原菌细胞生长处于最活跃的状态，优选地，所述培养基中，所述碳源、所述氮源和所述磷源的重量比为 10: (0.8-1.2): (0.1-0.4)。

根据本发明，优选地，所述无机盐包含硫酸钠、硫酸亚铁铵、硫酸镁和氯化钙，以及氯化钠和/或氯化钾。

根据本发明，优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养

基中包含：0.8-2g/L 的硫酸钠（例如可以为 0.8g/L、0.85g/L、0.9g/L、0.95g/L、1g/L、1.05g/L、1.1g/L、1.15g/L、1.2g/L、1.25g/L、1.3g/L、1.35g/L、1.4g/L、1.45g/L、1.5g/L、1.55g/L、1.6g/L、1.65g/L、1.7g/L、1.75g/L、1.8g/L、1.85g/L、1.9g/L、1.95g/L 和 2g/L 以及任意两个值之间组成的任意范围）、0.5-2g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$ （例如可以为 0.5g/L、0.6g/L、0.7g/L、0.8g/L、0.9g/L、1g/L、1.1g/L、1.2g/L、1.3g/L、1.4g/L、1.5g/L、1.6g/L、1.7g/L、1.8g/L、1.9g/L 和 2g/L 以及任意两个值之间组成的任意范围）、0.1-0.2g/L 的硫酸镁（例如可以为 0.1g/L、0.11g/L、0.12g/L、0.13g/L、0.14g/L、0.15g/L、0.16g/L、0.17g/L、0.18g/L、0.19g/L 和 0.2g/L 以及任意两个值之间组成的任意范围）和 0.03-0.07g/L 的氯化钙（例如可以为 0.03g/L、0.035g/L、0.04g/L、0.045g/L、0.05g/L、0.055g/L、0.06g/L、0.065g/L 和 0.07g/L 以及任意两个值之间组成的任意范围），以及 1-1.6g/L 的氯化钠和/或氯化钾（例如可以为 1g/L、1.1g/L、1.2g/L、1.3g/L、1.4g/L、1.5g/L 和 1.6g/L 以及任意两个值之间组成的任意范围）。

本发明中，如上所述的物质在配制培养基时，可以以含有或不含有结合水的形式存在， $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$ 可以为 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，在所述培养基中以不含结合水的形式计其含量。

根据本发明，优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基中包含：1.3-1.7g/L 的硫酸钠、1-1.5g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$ 、0.15-0.19g/L 的硫酸镁和 0.04-0.06g/L 的氯化钙，以及 1.2-1.4g/L 的氯化钠和/或氯化钾。

根据本发明的一种优选实施方式，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基包含：

7-15g/L 的碳源，所述碳源选自乳酸钠和/或葡萄糖；

0.5-1.7g/L 的氮源，所述氮源选自酵母粉和/或胰蛋白胨；

0.1-0.5g/L 的磷源，所述磷源选自 KH_2PO_4 和/或 K_2HPO_4 ；

无机盐：0.8-2g/L 的硫酸钠、0.5-2g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$ 、0.1-0.2g/L 的硫酸镁和 0.03-0.07g/L 的氯化钙，以及 1-1.6g/L 的氯化钠和/或氯化钾；

10-100mg/L 的电子中介物和 1-20mg/L 的 L-半胱氨酸。

本发明充分考虑 SRB 细胞生长代谢过程中所需的碳源、氮源、磷源和无机盐等各类营养物质，配方组分类型较其它培养基更加丰富完善，并且规定将各组分的浓度及配比控制在适宜 SRB 生长的范围内，更大程度地提供 SRB 适宜的生长环境，促进 SRB 快速生长代谢。

进一步地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基包含：

8-10g/L 的碳源，所述碳源选自乳酸钠和/或葡萄糖；

0.8-1g/L 的氮源，所述氮源选自酵母粉和/或胰蛋白胨；

0.2-0.4g/L 的磷源，所述磷源选自 KH_2PO_4 和/或 K_2HPO_4 ；

无机盐：1.3-1.7g/L 的硫酸钠、1-1.5g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$ 、0.15-0.19g/L 的硫酸镁和 0.04-0.06g/L 的氯化钙，以及 1.2-1.4g/L 的氯化钠和/或氯化钾；

35-45mg/L 的电子中介物和 5-10mg/L 的 L-半胱氨酸。

根据本发明的一种更优选的实施方式，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基包含：

碳源：8-10g/L 的乳酸钠；

氮源：0.8-1g/L 的胰蛋白胨；

磷源：0.2-0.4g/L 的 KH_2PO_4 ；

无机盐：1.3-1.7g/L 的硫酸钠、1-1.5g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$ 、0.15-0.19g/L 的硫酸镁和 0.04-0.06g/L 的氯化钙，以及 1.2-1.4g/L 的氯

化钠；

35-45mg/L 的核黄素和 5-10mg/L 的 L-半胱氨酸。

本发明的培养基可以为液体培养基，也可以为固体培养基。当培养基为液体培养基时，将硫酸盐还原菌在液体培养基中进行培养，含菌培养基液体变为黑色，即表示有硫酸盐还原菌生长；当培养基为固体培养基时，将硫酸盐还原菌在固体培养基中进行培养，通过固体培养基中的菌落数目，观察硫酸盐还原菌的生长情况。为了让细菌细胞繁殖形成肉眼可见的菌落，优选地，所述培养基为固体培养基，所述培养基还包含琼脂。

根据本发明，优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基中，琼脂的含量为 15-20g/L。

根据本发明，优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基包含：

碳源：7-15g/L 的乳酸钠；

氮源：0.5-1.7g/L 的胰蛋白胨；

磷源：0.1-0.5g/L 的 KH_2PO_4 ；

无机盐：0.8-2g/L 的硫酸钠、0.5-2g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$ 、0.1-0.2g/L 的硫酸镁和 0.03-0.07g/L 的氯化钙，以及 1-1.6g/L 的氯化钠；

10-100mg/L 的核黄素和 1-20mg/L 的 L-半胱氨酸。

优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基还包含 15-20g/L 的琼脂。

进一步地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基包含：

碳源：8-10g/L 的乳酸钠；

氮源：0.8-1g/L 的胰蛋白胨；

磷源：0.2-0.4g/L 的 KH_2PO_4 ；

无机盐：1.3-1.7g/L 的硫酸钠、1-1.5g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$ 、0.15-0.19g/L 的硫酸镁和 0.04-0.06g/L 的氯化钙，以及 1.2-1.4g/L 的氯化钠；

35-45mg/L 的核黄素和 5-10mg/L 的 L-半胱氨酸。

优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基还包含 15-20g/L 的琼脂。

本发明中，所述培养基的 pH 值为 6.8-7.3。

本发明第三方面提供一种本发明提供的培养基在硫酸盐还原菌的培养和检测中的用途。

与其它类型的细菌检测方法比较，因检测方法是基于细菌在本发明提供的培养基中生长培养形成的，所以用途本发明提供的培养基开展检测，检测周期短，能够充分排除死细胞数目的干扰，可广泛用于加注杀菌缓蚀剂前后的水样检测，也不需要依靠精密设备读数，能够充分满足快速、准确、下限低和简便的现场需求。

本发明第四方面提供一种硫酸盐还原菌的检测方法，所述方法包括：将硫酸盐还原菌在本发明提供的培养基进行培养，当硫酸盐还原菌在所述培养基形成稳定菌落数目时，读取菌落数目，从而得到待测样中硫酸盐还原菌的浓度。

以下将通过实施例对本发明进行详细描述。以下实施例中，如无特殊说明，均为常规方法；所用试剂和材料，如无特殊说明，均可从商业途径获得。

以下实施例用于说明硫酸盐还原菌培养基的配制。

实施例 1

按以下配方配制培养基：

以培养基的总体积为基准，培养基包含：9g/L 的乳酸钠、0.9g/L 的胰蛋白胨、1.8g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1.5g/L 的硫酸钠、0.3g/L 的 KH_2PO_4 、40mg/L 的核黄素、7mg/L 的 L-半胱氨酸、0.17g/L 的硫酸镁、1.3g/L 的氯化钠、0.045g/L 的无水氯化钙、16g/L 的琼脂和去离子水。在 121℃ 的条件下灭菌 30min。得到培养基，记为 S1。

实施例 2

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，碳源和氮源的种类不同，以葡萄糖代替等重量的乳酸钠；以酵母浸粉代替等重量的胰蛋白胨。得到培养基，记为 S2。

实施例 3

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，碳源和氮源的种类不同。具体地，以重量比为 1:1 的葡萄糖和乳酸钠的混合物代替等重量的乳酸钠，以重量比为 1:1 的胰蛋白胨和酵母浸粉的混合物代替等重量的胰蛋白胨。得到培养基，记为 S3。

实施例 4

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，以 K_2HPO_4 代替等重量的 KH_2PO_4 。得到培养基，记为 S4。

实施例 5

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，无机盐中，以氯化钾代替等重量的氯化钠。得到培养基，记为 S5。

实施例 6

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，乳酸钠和胰蛋白胨的用量不同。具体地，乳酸钠的用量为 12g/L，胰蛋白胨的用量为 1.5g/L。得到培养基，记为 S6。

实施例 7

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，无机盐中各组分用量不同。具体地，无机盐中各组分用量为：0.5g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.13g/L 的硫酸镁、1g/L 的硫酸钠、1g/L 的氯化钠和 0.03g/L 的无水氯化钙。得到培养基，记为 S7。

实施例 8

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，核黄素的用量为 35mg/L。得到培养基，记为 S8。

实施例 9

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，L-半胱氨酸的用量为 5mg/L。得到培养基，记为 S9。

实施例 10

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，核黄素的用量为 20mg/L。得到培养基，记为 S10。

实施例 11

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，核黄素的用量为 45mg/L。得到培养基，记为 S11。

实施例 12

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，L-半胱氨酸的用量为 10mg/L。得到培养基，记为 S12。

实施例 13

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，L-半胱氨酸的用量为 15mg/L。得到培养基，记为 S13。

实施例 14

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，核黄素的用量为 50mg/L。得到培养基，记为 S14。

对比例 1

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，培养基中不添加核黄素和 L-半胱氨酸。得到培养基，记为 D1。

对比例 2

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，培养基中不添加 L-半胱氨酸。得到培养基，记为 D2。

对比例 3

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，培养基中不添加核黄素。得到培养基，记为 D3。

对比例 4

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，选用 2,6-蒽醌二磺

酸(AQS)代替等重量的核黄素。得到培养基，记为 D4。

对比例 5

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，选用巯基乙醇代替等重量的 L-半胱氨酸。得到培养基，记为 D5。

对比例 6

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，选用维生素 C 代替等重量的 L-半胱氨酸。得到培养基，记为 D6。

对比例 7

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，L-半胱氨酸的用量为 25mg/L。得到培养基，记为 D7。

对比例 8

按照实施例 1 的配方配制培养基，不同的是，核黄素的用量为 110mg/L。得到培养基，记为 D8。

测试例 1

将 S1-S14 培养基和 D1-D6 培养基各配制三份，依次记为 S1#1、S1#2、S1#3、S2#1、S2#2、S2#3、.....、S14#1、S14#2、S14#3、.....、D8#1、D8#2、D8#3。#1 用于检测还原菌（SRB）在培养基中的生长繁殖情况，#2 用于检测铁细菌（FB）在培养基中的生长繁殖情况，#3 用于检测腐生菌（TGB）在培养基中的生长繁殖情况。待检测的 SRB、FB 和 TGB 的培养液的浓度均为 10^3 级。分别将 SRB、FB 和 TGB 的培养液用去离子水稀释 100 倍，再用移液管取 20 μ L 稀释后的

待测水样，分别滴加到配制好的 S1-S14 培养基和 D1-D8 培养基表面；用涂布棒将滴加在培养基表面的菌液均匀地涂抹在整个培养基表面，整个操作过程在厌氧操作台上完成；将完成涂布的培养基进行密封，放入电热恒温培养箱中，在 37℃ 培养 72 小时。取出培养基，观察培养 SRB、FB 和 TGB 的 S1-S14 培养基和 D1-D8 培养基表面形成的菌落数目，每个培养基实验重复进行 10 次，取平均值，结果如表 1 所示。

表 1

培养基	SRB 菌落数目, 个	FB 菌落数目, 个	TGB 菌落数目, 个
S1	84	0	0
S2	66	0	0
S3	70	0	4
S4	72	0	0
S5	75	0	3
S6	74	0	0
S7	71	0	3
S8	80	0	0
S9	82	0	0
S10	69	0	0
S11	81	0	0
S12	80	0	0
S13	72	0	0
S14	71	0	0
D1	43	3	3
D2	52	3	2
D3	49	0	0
D4	58	0	0
D5	55	5	6
D6	56	6	3
D7	61	0	0
D8	59	0	0

由表 1 的结果可以看出，各实施例培养基表面形成的 SRB、FB 和 TGB 的菌落数目均存在明显的差异，加入硫酸盐还原菌菌液的培养基表面生长出的菌落数目显著大于加入其它两类细菌培养液的培

培养基，待检测的 SRB、FB 和 TGB 的培养液的浓度均为 10^3 级，表明本发明的培养基具有较好的选择性，仅硫酸盐还原菌细胞能够在培养基中正常生长和繁殖，能够特异性地检测硫酸盐还原菌。

其中，硫酸盐还原菌在 S2-S7、S10 和 S13、S14 培养基中培养 72h 后培养基表面形成的菌落数目较 S1 培养基更少，说明碳源、氮源和磷源的种类和用量，无机盐的组成和用量，核黄素和 L-半胱氨酸的用量均对硫酸盐还原菌在培养基形成的菌落数目有较大影响；而 S3、S5 和 S7 培养基中还有少量 TGB 生长，说明碳源和氮源的种类，以及无机盐的组成和用量不仅影响硫酸盐还原菌在培养基形成的菌落数目，还会影响培养基对硫酸盐还原菌的选择性。而不添加核黄素和 L-半胱氨酸的 D1 培养基，不添加 L-半胱氨酸的 D2 培养基，和用其他组分代替 L-半胱氨酸的 D5 和 D6，不仅在 72h 后形成的硫酸盐还原菌菌落数目较少，FB 和 TGB 的菌落数目也有一定程度增加，说明培养基中不添加 L-半胱氨酸，或用其他组分代替 L-半胱氨酸，不仅会影响硫酸盐还原菌菌落形成的数量，还会降低对硫酸盐还原菌的选择性。硫酸盐还原菌在 D3、D4、D7 和 D8 培养基培养 72h 后形成的菌落数目较在 S1-S14 培养基中减少，说明培养基中不添加电子中介物，或改变电子中介物的种类，或 L-半胱氨酸用量大于 20mg/L，或核黄素的用量大于 100mg/L 会影响硫酸盐还原菌菌落形成的数量。

测试例 2

分别按照实施例 1-14 和对比例 1-8 的配方配制培养基 S1-S14 及 D1-D8，同时，按照标准配方配制国内外常用的 Postgate's B (PB) 培养基、Postgate's C (PC) 培养基和 Modified Baar's (MB) 培养基作为对照。取测试例 1 中硫酸盐还原菌浓度为 10^3 级的菌液，按照测试例 1 的稀释倍数和操作方法，分别将同样的菌液滴加和涂布在各培养基

的表面，并于电热恒温培养箱中培养，每小时读取菌落数目，菌落数目不再增长时所用的培养时间即为各培养基表面生长形成稳定菌落数目的时间。结果如表 2 所示。

表 2

培养基	形成稳定菌落数目的时间，h
S1	32
S2	43
S3	41
S4	38
S5	40
S6	37
S7	38
S8	34
S9	33
S10	44
S11	34
S12	34
S13	43
S14	38
D1	85
D2	68
D3	76
D4	72
D5	68
D6	62
D7	61
D8	73
PB	96
PC	64
MB	72

由表 2 可以看出，本发明的 S1-S14 培养基所用的时间为 32-44h，其余培养所用的时间均不低于 61h，由此说明，本发明的培养基能够有效加速硫酸盐还原菌菌落的形成，缩短硫酸盐还原菌纯化和检测时间。

测试例 3

分别按照实施例 1-14 和对比例 1-8 的配方配制培养基 S1-S14 及 D1-D8，同时，按照标准配方配制国内外常用的 Postgate's B (PB) 培养基、Postgate's C (PC) 培养基和 Modified Baar's (MB) 培养基作为对照。

取一定量浓度为 10^2 级的川南某页岩气田返排液稀释 10 倍后，分别滴加和涂布在上述培养基平板上，并将涂布有返排液的各培养基平板于电热恒温培养箱中培养 72h，挑取各培养基平板中的 1 个肉眼可见的最大菌落溶于 5mL 生理盐水中，按照 MPN 法对生理盐水中的硫酸盐还原菌量进行计数，结果如表 3。

表 3

培养基	硫酸盐还原菌量，个/mL
S1	4.5×10^5
S2	6×10^4
S3	7.5×10^4
S4	6.5×10^4
S5	3.5×10^4
S6	4×10^4
S7	3×10^4
S8	1.1×10^5
S9	1.8×10^5
S10	2.5×10^4
S11	1.9×10^5
S12	1.8×10^5
S13	7×10^4
S14	4.5×10^4
D1	9.5×10^2
D2	8×10^3
D3	4.5×10^3
D4	3×10^3
D5	6.5×10^3
D6	8×10^3
D7	7×10^3
D8	6×10^3

PB	1.8×10^3
PC	1.1×10^3
MB	1.5×10^3

由表 3 可以看出，本发明的 S1-S14 培养基 72h 富集得到的单个菌落中的硫酸盐还原菌菌量均大于其余培养基，由此说明，本发明的培养基能够适宜硫酸盐还原菌菌落的快速生长。

以上详细描述了本发明的优选实施方式，但是，本发明并不限于此。在本发明的技术构思范围内，可以对本发明的技术方案进行多种简单变型，包括各个技术特征以任何其它的合适方式进行组合，这些简单变型和组合同样应当视为本发明所公开的内容，均属于本发明的保护范围。

权利要求书

1、电子中介物和 L-半胱氨酸的组合在促进硫酸盐还原菌生长中的用途，其特征在于，当培养基中所述电子中介物的含量为 10-100mg/L，L-半胱氨酸的含量为 1-20mg/L 时，硫酸盐还原菌在所述培养基形成稳定菌落数目的时间在 24-44h，优选为 30-35h；其中，所述电子中介物选自核黄素和/或黄素腺嘌呤二核苷酸。

2、一种硫酸盐还原菌培养基，其特征在于，所述培养基包含电子中介物和 L-半胱氨酸；以所述培养基的总体积为基准，所述培养基中，所述电子中介物的含量为 10-100mg/L，L-半胱氨酸的含量为 1-20mg/L；其中，所述电子中介物选自核黄素和/或黄素腺嘌呤二核苷酸。

3、根据权利要求 2 所述的培养基，其特征在于，所述培养基还包含碳源、氮源、磷源和无机盐；

优选地，所述碳源选自乳酸钠和/或葡萄糖，优选为乳酸钠；

优选地，所述氮源选自酵母粉和/或胰蛋白胨，优选为胰蛋白胨；

优选地，所述磷源选自 KH_2PO_4 和/或 K_2HPO_4 ，优选为 KH_2PO_4 。

4、根据权利要求 3 所述的培养基，其特征在于，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基中，所述电子中介物的含量为 35-45mg/L，L-半胱氨酸的含量为 5-10mg/L；

优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基中，所述碳源的含量为 7-15g/L，优选为 8-10g/L；

优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基中，所述氮

源的含量为 0.5-1.7g/L，优选为 0.8-1g/L；

优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基中，所述磷源的含量为 0.1-0.5g/L，优选为 0.2-0.4g/L。

5、根据权利要求 3 或 4 所述的培养基，其特征在于，所述无机盐包含硫酸钠、硫酸亚铁铵、硫酸镁和氯化钙，以及氯化钠和/或氯化钾；

优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基中包含：0.8-2g/L 的硫酸钠、0.5-2g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$ 、0.1-0.2g/L 的硫酸镁和 0.03-0.07g/L 的氯化钙，以及 1-1.6g/L 的氯化钠和/或氯化钾；

优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基中包含：1.3-1.7g/L 的硫酸钠、1-1.5g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$ 、0.15-0.19g/L 的硫酸镁和 0.04-0.06g/L 的氯化钙，以及 1.2-1.4g/L 的氯化钠和/或氯化钾。

6、根据权利要求 2-5 中任意一项所述的培养基，其特征在于，所述培养基还包含琼脂；

优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基中，琼脂的含量为 15-20g/L。

7、根据权利要求 2-6 中任意一项所述的培养基，其特征在于，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基包含：

碳源：7-15g/L 的乳酸钠；

氮源：0.5-1.7g/L 的胰蛋白胨；

磷源：0.1-0.5g/L 的 KH_2PO_4 ；

无机盐：0.8-2g/L 的硫酸钠、0.5-2g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$ 、0.1-0.2g/L 的硫酸镁和 0.03-0.07g/L 的氯化钙，以及 1-1.6g/L 的氯化钠；

10-100mg/L 的核黄素和 1-20mg/L 的 L-半胱氨酸；

优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基还包含 15-20g/L 的琼脂。

8、根据权利要求 7 所述的培养基，其特征在于，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基包含：

碳源：8-10g/L 的乳酸钠；

氮源：0.8-1g/L 的胰蛋白胨；

磷源：0.2-0.4g/L 的 KH_2PO_4 ；

无机盐：1.3-1.7g/L 的硫酸钠、1-1.5g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$ 、0.15-0.19g/L 的硫酸镁和 0.04-0.06g/L 的氯化钙，以及 1.2-1.4g/L 的氯化钠；

35-45mg/L 的核黄素和 5-10mg/L 的 L-半胱氨酸；

优选地，以所述培养基的总体积为基准，所述培养基还包含 15-20g/L 的琼脂。

9、权利要求 2-8 中任意一项所述的培养基在硫酸盐还原菌的培养和检测中的用途。

10、一种硫酸盐还原菌的检测方法，其特征在于，所述方法包括：将硫酸盐还原菌在权利要求 2-8 中任意一项所述的培养基进行培养，当硫酸盐还原菌在所述培养基形成稳定菌落数目时，读取菌落数目，从而得到待测样中硫酸盐还原菌的浓度。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/071193

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 1/00(2006.01)i; C12Q 1/04(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C12N、C12Q Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DWPI, SIPOABS, CNABS, CNTXT, ISI Web of knowledge, NCBI PUBMED, CNKI, 万方, WANFANG: 硫酸盐还原菌, 核黄素, 黄素腺嘌呤二核苷酸, 半胱氨酸, Riboflavin, flavin adenine dinucleotide, cysteine, Cys, SRB		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 114634897 A (INNER MONGOLIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 17 June 2022 (2022-06-17) description, paragraphs 22-33	1-10
A	CN 101570737 A (HARBIN INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 04 November 2009 (2009-11-04) claims	1-10
A	CN 105899669 A (TOTAL RESEARCH AND TECHNOLOGY FELUY) 24 August 2016 (2016-08-24) claims	1-10
A	WO 2014127351 A2 (WASHINGTON UNIVERSITY; REY, FEDERICO E.; GONZALEZ, MARK; GORDON, JEFFREY I.) 21 August 2014 (2014-08-21) claims	1-10
A	WO 2014140340 A1 (TOTAL RESEARCH & TECHNOLOGY FELUY; COSKATA, INC.; ENZIEN, MICHAEL; HICKEY, ROBERT; LEVINSON, WILLIAM; VERMEIREN, WALTER) 18 September 2014 (2014-09-18) claims	1-10
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“D” document cited by the applicant in the international application</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 21 February 2024		Date of mailing of the international search report 02 March 2024
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2024/071193

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114634897	A	17 June 2022	None			
CN	101570737	A	04 November 2009	None			
CN	105899669	A	24 August 2016	WO	2014140335	A1	18 September 2014
				US	2014273120	A1	18 September 2014
				US	9650651	B2	16 May 2017
WO	2014127351	A2	21 August 2014	EP	2956152	A2	23 December 2015
				EP	2956152	A4	26 October 2016
				US	2016000837	A1	07 January 2016
				WO	2014127351	A3	06 November 2014
WO	2014140340	A1	18 September 2014	US	2016153011	A1	02 June 2016
				US	2014273124	A1	18 September 2014

A. 主题的分类

C12N 1/00(2006.01)i; C12Q 1/04(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N、C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: DWPI、SIPOABS、CNABS、CNTXT、ISI Web of knowledge、NCBI PUBMED、CNKI、万方; 关键词: 硫酸盐还原菌、核黄素、黄素腺嘌呤二核苷酸、半胱氨酸、Riboflavin、flavin adenine dinucleotide、cysteine、Cys、SRB

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 114634897 A (内蒙古工业大学) 2022年6月17日 (2022 - 06 - 17) 说明书第22-33段	1-10
A	CN 101570737 A (哈尔滨工业大学) 2009年11月4日 (2009 - 11 - 04) 权利要求书	1-10
A	CN 105899669 A (赛纳塔生物有限公司) 2016年8月24日 (2016 - 08 - 24) 权利要求书	1-10
A	WO 2014127351 A2 (UNIV WASHINGTON;REY FEDERICO E;GONZALEZ MAR-K;GORDON JEFFREY I;) 2014年8月21日 (2014 - 08 - 21) 权利要求书	1-10
A	WO 2014140340 A1 (TOTAL RES & TECHNOLOGY FELUY;COSKATA INC;ENZIEN MICHAEL;HICKEY ROBERT;LEVINSON WILLIAM;VERMEIREN WALTER;) 2014年9月18日 (2014 - 09 - 18) 权利要求书	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年2月21日

国际检索报告邮寄日期

2024年3月2日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

张起

电话号码 (+86) 010-62411036

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2024/071193

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	114634897	A	2022年6月17日	无			
CN	101570737	A	2009年11月4日	无			
CN	105899669	A	2016年8月24日	WO	2014140335	A1	2014年9月18日
				US	2014273120	A1	2014年9月18日
				US	9650651	B2	2017年5月16日
WO	2014127351	A2	2014年8月21日	EP	2956152	A2	2015年12月23日
				EP	2956152	A4	2016年10月26日
				US	2016000837	A1	2016年1月7日
				WO	2014127351	A3	2014年11月6日
WO	2014140340	A1	2014年9月18日	US	2016153011	A1	2016年6月2日
				US	2014273124	A1	2014年9月18日