

(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
2018 年 8 月 16 日 (16.08.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/145338 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/075336

(22) 国际申请日: 2017 年 3 月 1 日 (01.03.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710067710.X 2017 年 2 月 7 日 (07.02.2017) CN

(71) 申请人: 盎亿泰地质微生物技术 (北京) 有限公司 (ADVANCED ENERGY & ENVIRONMENTAL TECHNOLOGIES, INC.) [CN/CN]; 中国北京市昌平区昌平科技园华通路 11 号 4 层, Beijing 102200 (CN)。

(72) 发明人: 郝纯(HAO, Chun); 中国北京市昌平区昌平科技园华通路 11 号 4 层, Beijing 102200 (CN)。
梅海(MEI, Hai); 中国北京市昌平区昌平科技园华通路 11 号 4 层, Beijing 102200 (CN)。

(74) 代理人: 北京集佳知识产权代理有限公司 (UNITALEN ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市朝阳区建国门外大街 22 号赛特广场 7 层, Beijing 100004 (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,

JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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: METHOD FOR DETECTING AND COUNTING RELATIVE CONTENT OF MICROORGANISM

(54) 发明名称: 一种微生物相对含量检测计数方法

(57) Abstract: Provided is a method for detecting and counting the relative content of a microorganism, comprising: adding a redox indicator to a growth medium to produce an indicating growth medium; the range of color variation of the redox indicator comprising three or more colors that can be easily recognized by the naked eye; diluting a sample to be tested, configuring multiple degrees of dilution, configuring multiple parallels for each degree of dilution, and growing the diluted test sample using the indicating growing medium; reading the color or absorbance of the indicating growth medium while growing and/or when growing is completed; and producing the relative content of a microorganism in the test sample on the basis of the level of color variation or the value of absorbance variation of the indicating growth medium. Compared with a conventional MPN method, the method is of increased precision in detecting the relative content of different sample microorganisms, acquires data of improved continuity, and has a wide range of applications.

(57) 摘要: 提供了一种微生物相对含量检测计数方法, 包括: 将氧化还原指示剂加入培养基, 得到指示培养基; 该氧化还原指示剂的变色范围包括 3 种或 3 种以上肉眼可轻易辨识的颜色; 将待测样本进行稀释, 设置多个稀释度, 每个稀释度设置多个平行, 将稀释后的待测样本采用指示培养基进行培养; 培养期间和/或培养结束后读取指示培养基的颜色或吸光度; 根据指示培养基的颜色变化程度或吸光度变化值, 得到待测样本中微生物的相对含量。与常规的 MPN 法相比, 该方法对于不同样品微生物相对含量的检测更加精确, 所获得的数据连续性较好, 适用范围广。

WO 2018/145338 A1

一种微生物相对含量检测计数方法

本申请要求于 2017 年 02 月 07 日提交中国专利局、申请号为 201710067710.X、发明名称为“一种微生物相对含量检测计数方法”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

5

技术领域

本发明涉及微生物检测技术领域，特别涉及一种微生物相对含量检测计数方法。

10 背景技术

油气藏中的轻烃气体在油气藏压力的驱动下以微泡上浮形式或连续气相流形式沿复杂的微裂隙垂直地向上运移。轻烃运移进入表层沉积物过程中，一部分成为土壤中专性烃氧化菌的食物（碳源）而使烃氧化菌异常发育；另一部分则被黏土矿物吸附和次生碳酸盐胶结物所包裹。因此，在油藏上方表层土壤中形成了与下伏油气藏的丰度与压力有正相关关系的微生物异常和吸附烃异常。采用微生物学方法（MOST）和地球化学方法（SSG）分别检测微生物异常和吸附烃异常就可以预测下伏地层中是否存在油气藏，以及油气藏的性质。MOST技术既相似于但又有别于以往的油气化探，它的主要监测目标是勘探靶区上方的土壤或沉积物中专属烃氧化菌的丰度（简称为MV值），热成因烃是这种氧化烃菌的唯一碳源，因此，它的丰度与隐伏于探区下方油气圈闭中的烃类浓度和压力密切相关，指标体系具有地质解释的唯一性。对于烃氧化菌的丰度常采用最大可能数法进行检测。

最大可能数法（Most probable number, MPN），该法又称稀释培养计数，是目前微生物检测领域常用的方法之一，适用于测定在一个混杂的微生物群落中虽不占优势，但却具有特殊生理功能的类群。其特点是利用待测微生物的特殊生理功能的选择性来摆脱其他微生物类群的干扰，并通过该生理功能的表现来判断该类群微生物的存在和丰度。本法特别适合于测定土壤微生物中的特定生理群（如烃氧化、氨化、硝化、纤维素分解、固氮、硫化和反硫化细菌等）

-2-

的数量和检测污水、牛奶及其他食品中特殊微生物类群(如大肠菌群)的数量。

MPN计数是将待测样品作一系列稀释,一直稀释到将少量(如1ml)的稀释液接种到新鲜培养基中没有或极少出现生长繁殖。根据没有生长的最低稀释度与出现生长的最高稀释度,采用“最大或然数”理论,可以计算出样品单位体

5 积中细菌数的近似值。具体地说,菌液经多次10倍梯度稀释后,一定量菌液中细菌可以极少或无菌,然后每个稀释度取3~5次重复接种于适宜的液体培养基中。培养后,将有菌液生长的最后3个稀释度(即临界级数)中出现细菌生长的管数作为数量指标,由最大或然数表上查出近似值,再乘以数量指标第一位数的稀释倍数,即为原菌液中的含菌数。

10 MPN法有一定的局限性,比如相同的MPN值可能有不同的含义,MPN值也是非连续的,MPN值的准确度随最大概率(P_{max})的减小而减小等。在读数的时候,标准的MPN法只记录培养结果是有菌生长的阳性,或者无菌生长的阴性,这种操作会降低MPN法的精确度。例如对于MPN法中某个稀释度的某个平行样,其培养出现了阳性,但是其阳性的程度却存在差异,其可能是大

15 量微生物生长造成的阳性,也可能是少量微生物生长造成的阳性。例如两个样品,使用3个连续稀释度,每组3个管,当其阳性管数都为“3-3-2”时,对应的MPN值均为1100,但是这两个样品的阳性管可能有不同的反应程度,其真实的微生物量可能有差异,但是常规的MPN法区分不出这样的差异。

另外,在读数的时候,标准的MPN法只在培养到一定时间时进行一次读

20 数,并记录阳性反应的个数,并查询MPN表得出结果。一次读数只能记录一定培养时间时培养基的阳性反应,其精确度不高。例如两个微生物数量有差异的样品进行液体培养,微生物数量多的样品在6小时的时候呈现阳性反应,微生物数量少的样品在12小时的时候呈现阳性反应,如果在12小时的时候读数,这两个样品都被记为阳性,实际上其微生物数量是有差别的。

25 因此,需要提供一种结果准确度更高的微生物相对含量检测计数方法。

发明内容

有鉴于此,本发明提供了一种微生物相对含量检测计数方法。该微生物相对含量检测计数方法与常规的MPN法相比,对于不同样品微生物相对含量的

—3—

检测更加精确和准确，不同样品微生物相对含量的可对比性也更高，适用范围广。

为了实现上述发明目的，本发明提供以下技术方案：

本发明提供了一种微生物相对含量检测计数方法，包括如下步骤：

5 步骤 1：将氧化还原指示剂加入培养基，得到指示培养基；该氧化还原指示剂的变色范围包括 3 种或 3 种以上肉眼可轻易辨识的颜色；

步骤 2：将待测样本进行稀释，设置 3~15 个稀释度，每个稀释度设置 3~15 个平行，将稀释后的待测样本采用指示培养基进行培养；

步骤 3：培养期间和/或培养结束后读取指示培养基的颜色或吸光度；

10 步骤 4：根据指示培养基的颜色变化程度或吸光度变化值，得到待测样本中微生物的相对含量。

作为优选，氧化还原指示剂为刃天青或甲基蓝。

在本发明提供的实施例中，氧化还原指示剂为刃天青。

15 在本发明提供的一优选方案中，步骤 3 为培养结束后读取指示培养基的颜色，步骤 4 中根据指示培养基的颜色变化程度，得到待测样本中微生物的相对含量为：

根据指示培养基的颜色与微生物含量之间的相关性，对指示培养基的颜色进行读数，读数的数字大小与微生物含量呈正相关；

采用如下公式获得待测样本中微生物的相对含量：

20
$$Z = (X_{1-1} + X_{1-2} + \cdots + X_{1-n}) \times Y_1 + (X_{2-1} + X_{2-2} + \cdots + X_{2-n}) \times Y_2 + \cdots + (X_{m-1} + X_{m-2} + \cdots + X_{m-n}) \times Y_m$$

25 其中，Z 为待测样本中微生物的相对含量；m 为 m 号稀释度， $3 \leq m \leq 15$ ；n 为 n 号平行样， $3 \leq n \leq 15$ ；X 为读数值， $X \geq 0$ ； X_{m-n} 代表 m 号稀释度 n 号平行样的读数值；Y 代表稀释度系数， $Y > 0$ ； Y_m 代表 m 号稀释度系数，并且取 $Y_m \geq Y_{m-1} \geq Y_{m-2} \geq \cdots Y_2 \geq Y_1$ 。

在本发明中，读数的数字大小与微生物含量呈正相关，例如：微生物不生长时，指示剂本身的颜色使用较小的数字，微生物大量生长指示剂完全变化之后的颜色使用较大的数字。例如：采用刃天青指示剂时，根据微生物含量由无到有，指示剂的颜色变化范围为蓝色-紫色-洋红色-红色-无色，读数分别为 0、

1、2、3、4。

在本发明提供的另一优选方案中，步骤3为培养期间和培养结束后读取指示培养基的颜色，培养期间和培养结束后读取指示培养基的颜色的次数至少为2次。培养期间读取指示培养基的颜色的次数至少为1次。

5 作为优选，培养期间和培养结束后每次读数时间间隔均匀或不均匀分配。对于读数时间间隔均匀分配的方案，读数时间间隔为培养总天数与读数总次数的比。对于读数时间间隔不均匀分配的方案，读数时间间隔可根据培养总天数和读数总次数进行适当调整。

10 在该优选方案中，步骤4中根据指示培养基的颜色变化程度，得到待测样本中微生物的相对含量为：

根据指示培养基的颜色与微生物含量之间的相关性，将指示培养基的颜色记录为数字，数字的大小与微生物含量呈正相关；

采用如下公式获得待测样本培养期间或培养结束后一次读数的最终计数数值：

15
$$Z_i = (X_{i-1} + X_{i-2} + \dots + X_{i-n}) \times Y_1 + (X_{2-1} + X_{2-2} + \dots + X_{2-n}) \times Y_2 + \dots + (X_{m-1} + X_{m-2} + \dots + X_{m-n}) \times Y_m$$

20 其中， Z_i 为一次读数的最终计数数值； i 为培养期间和培养结束后读取指示培养基的颜色的次数， $i \geq 2$ ； m 为 m 号稀释度， $3 \leq m \leq 15$ ； n 为 n 号平行样， $3 \leq n \leq 15$ ； X 为读数值， $X \geq 0$ ； X_{m-n} 代表 m 号稀释度 n 号平行样的读数值； Y 代表稀释度系数， $Y > 0$ ； Y_m 代表 m 号稀释度系数，并且取 $Y_m \geq Y_{m-1} \geq Y_{m-2} \geq \dots \geq Y_2 \geq Y_1$ ；

采用如下公式获得待测样本中微生物的相对含量：

$$Z = Z_1 + \dots + Z_i$$

25 其中， Z 为待测样本中微生物的相对含量； Z_i 为一次读数的最终计数数值； i 为培养期间和培养结束后读取指示培养基的颜色的次数， $i \geq 2$ 。

在本发明提供的另一优选方案中，步骤3为培养结束后读取指示培养基的吸光度，步骤4中根据指示培养基的吸光度变化值，得到待测样本中微生物的相对含量为：

根据指示培养基的吸光度变化值，采用如下公式获得待测样本中微生物的

—5—

相对含量:

$$Z=(X_{1-1}+X_{1-2}+\cdots+X_{1-n}) \times Y_1 + (X_{2-1}+X_{2-2}+\cdots+X_{2-n}) \times Y_2 + \cdots + (X_{m-1}+X_{m-2}+\cdots+X_{m-n}) \times Y_m$$

其中, Z 为待测样本中微生物的相对含量; m 为 m 号稀释度, $3 \leq m \leq 15$; n 为 n 号平行样, $3 \leq n \leq 15$; X 为读取指示培养基的吸光度变化值; X_{m-n} 代表 m 号稀释度 n 号平行样的吸光度变化值; Y 代表稀释度系数, $Y > 0$; Y_m 代表 m 号稀释度系数, 并且取 $Y_m \geq Y_{m-1} \geq Y_{m-2} \geq \cdots Y_2 \geq Y_1$ 。

在本发明提供的另一优选方案中, 步骤 3 为培养期间和培养结束后读取指示培养基的吸光度, 培养期间和培养结束后读取指示培养基的吸光度的次数至少为 2 次。培养期间读取指示培养基的吸光度的次数至少为 1 次。

在该优选方案中, 步骤 4 中根据指示培养基的吸光度变化值, 得到待测样本中微生物的相对含量为:

根据指示培养基的吸光度变化值, 采用如下公式获得待测样本一次读数的最终计数数值:

$$Z_i=(X_{1-1}+X_{1-2}+\cdots+X_{1-n}) \times Y_1 + (X_{2-1}+X_{2-2}+\cdots+X_{2-n}) \times Y_2 + \cdots + (X_{m-1}+X_{m-2}+\cdots+X_{m-n}) \times Y_m$$

其中, Z_i 为一次读数的最终计数数值; i 为培养期间和培养结束后读取指示培养基的吸光度的次数, $i \geq 2$; m 为 m 号稀释度, $3 \leq m \leq 15$; n 为 n 号平行样, $3 \leq n \leq 15$; X 为吸光度变化值; X_{m-n} 代表 m 号稀释度 n 号平行样的吸光度变化值; Y 代表稀释度系数, $Y > 0$; Y_m 代表 m 号稀释度系数, 并且取 $Y_m \geq Y_{m-1} \geq Y_{m-2} \geq \cdots Y_2 \geq Y_1$;

采用如下公式获得待测样本中微生物的相对含量:

$$Z=Z_1+\cdots+Z_i$$

其中, Z 为待测样本中微生物的相对含量; Z_i 为一次读数的最终计数数值; i 为培养期间和培养结束后读取指示培养基的吸光度的次数, $i \geq 2$ 。

作为优选, 吸光度的检测波长为氧化还原指示剂的最大吸收光波长。

本发明提供了一种微生物相对含量检测计数方法。该方法包括: 将氧化还原指示剂加入培养基, 得到指示培养基; 该氧化还原指示剂的变色范围包括 3 种或 3 种以上肉眼可轻易辨识的颜色; 将待测样本进行稀释, 设置 3~15 个稀释

度，每个稀释度设置3~15个平行，将稀释后的待测样本采用指示培养基进行培养；培养期间和/或培养结束后读取指示培养基的颜色或吸光度；根据指示培养基的颜色变化程度或吸光度变化值，得到待测样本中微生物的相对含量。本发明具有如下有益效果：

- 5 1、本发明中将变色范围包括3种或3种以上肉眼可轻易辨识的颜色的氧化还原指示剂应用于MPN法，可实现对阳性反应的程度进行区分，可有效改善MPN法所获得数据之间的可比性；

本发明在培养期进行多次读数可进一步改善MPN法所获得数据之间的可比性；

- 10 可见本发明提供的微生物相对含量检测计数方法与常规的MPN法相比，对于不同样品微生物相对含量的检测更加精确和准确，不同样品微生物相对含量的可对比性也更高，所获得的数据连续性较好，适用范围广。

2、本发明通过将本发明方法、MPN法分别与镜检计数法进行相关性分析，结果显示，本发明方法与镜检计数法的相关性更强，结果与实际更加相符。

15

附图说明

图1示实施例1中某海域圈闭采用标准MPN法对于烃氧化菌相对含量检测结果；

- 20 图2示实施例1中某海域圈闭采用本发明方法对于烃氧化菌相对含量检测结果；

图3示实施例2中某海域油气藏上方海洋沉积物采用标准MPN法对于烃氧化菌相对含量检测结果；

图4示实施例2中某海域油气藏上方海洋沉积物采用本发明方法对于烃氧化菌相对含量检测结果；

- 25 图5示实施例3中本发明方法及MPN法对不动杆菌的计数结果与镜检计数结果的对比图；

图6示实施例4中某海域油气藏上方海洋沉积物采用标准MPN法对于烃氧化菌相对含量检测结果；

图7示实施例4中某海域油气藏上方海洋沉积物采用本发明方法对于烃氧

化菌相对含量检测结果。

具体实施方式

本发明公开了一种微生物相对含量检测计数方法，本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。

本发明提供了一种用于微生物相对含量检测计数的方法，包含以下步骤：

1) 选择一种变色范围显著的微生物生长指示剂，并在培养基中加入该指示剂；

2) 按照常规MPN法的操作，按照需要，设置多个稀释度，每个稀释度设置多个平行并进行培养；

3) 培养一段时间后，进行读数，读数时记录微生物生长指示剂的变化程度；

4) 根据微生物的生长时间情况，设置多个读数时间点，进行多次读数；

5) 利用每次读数获得的指示剂的变化程度的数据和多次读数的结果，计算出样品中微生物的可能含量。

其中，步骤3) 和步骤4) 并不必须同时操作，只操作3) 或者只操作4) 也可以达到提高MPN法精度的效果，结合起来效果更好。

作为优选，步骤1) 中变色范围显著的微生物生长指示剂包括刃天青等。

作为优选，步骤3) 中微生物生长指示剂的变化程度的读取采用肉眼观察法或者使用分光光度计进行吸光度测量。

作为优选，按照肉眼可轻易辨识颜色差异的标准，把指示剂变色范围分成3种及以上的颜色，读数时记录下指示剂的颜色，并使用由小到大的数字来代替从指示剂本身颜色到完全变色之间不同的指示剂颜色。微生物不生长时，指示剂本身的颜色使用较小的数字，微生物大量生长指示剂完全变化之后的颜色使用较大的数字。

作为优选，使用指示剂的最大吸收光波长值作为测量的光线波长，使用分光光度计测量培养开始时培养液的吸光度，培养一段时间后，对培养液的吸光度进行测量，并记录下吸光度的变化值。

作为优选，步骤4) 多个读数时间点为2及其以上个读数时间点。

5 作为优选，步骤5) 计算的方法是，设置每个稀释度的系数，小的稀释度所设置的系数 $\leq$ 大的稀释度所设置的系数。对于肉眼观察法，将权利要求4中所述某一稀释度每个平行样所读取的数字均乘以该稀释度所对应的系数并相加，可以得到该稀释度的结果。将每个稀释度的结果相加，可以得到该读数点的结果。将所有读数点该样品的结果相加，可以得到该样品的最终结果。

10 作为优选，步骤5) 计算的方法是，设置每个稀释度的系数，小的稀释度所设置的系数 $\leq$ 大的稀释度所设置的系数。对于吸光度测量法，将权利要求5中所述某一稀释度每个平行样测量所得到的吸光度变化值均乘以该稀释度所对应的系数并相加，可以得到该稀释度的结果。将每个稀释度的结果相加，可以得到该读数点的结果。将所有读数点该样品的结果相加，可以得到该样品的最终结果。

15

本发明提供的微生物相对含量检测计数方法中所用试剂或仪器均可由市场购得。

下面结合实施例，进一步阐述本发明：

20 实施例1

该实施例样品采集于某海域含油气圈闭上方，取海洋沉积物对其中的烃氧化菌进行检测，以期研究海域含油气圈闭上方烃氧化菌发育情况。

本发明微生物相对含量检测计数的方法具体实施步骤如下：

1. 根据地球物理方法发现的圈闭构造，采取均匀网格的方式布设采样点，
25 采集了 42 个样品，样品采集间距为 500m，采集深度为 20cm。样品采集后迅速冷冻，并保持冷冻状态运送到检测实验室，在实验室内储存于冷冻状态下。

2. 称取 5g 样品置于 20mL 烃氧化菌培养液中，混匀，制成样品原液。培养液参考 U.S. patent 5093236 (Victoria Gonzales-Prevatt, 1992) 中的实施例。微生物生长指示剂为刃天青。

—9—

3. 吸取 1mL 步骤 2 中的样品原液到 9mL 灭菌的培养液中，混匀，制成小稀释度培养液。再从小稀释度培养液中取 1mL 到另一个 9mL 灭菌的培养液中，混匀，制成中稀释度培养液。再从中稀释度培养液中取 1mL 到另一个 9mL 灭菌的培养液中，混匀，制成大稀释度培养液。每种稀释度培养液设置三个平行样，这样，形成三稀释度，每稀释度三平行样的 MPN 检测体系。

4. 42 个样品均按照步骤 2 和 3 所述方法设置 MPN 检测体系。接种完毕后，置于 24℃ 培养 15 天。

5. 每间隔 3 天进行一次读数。读数时观察培养液的颜色，蓝色记为 0，紫色记为 1，洋红色记为 2，红色记为 3，无色记为 4。

6. 对于每次读数，按照以下公式进行计算：

$$Z=(X_{1-1}+X_{1-2}+\cdots+X_{1-n})\cdot Y_1+(X_{2-1}+X_{2-2}+\cdots+X_{2-n})\cdot Y_2+\cdots+(X_{m-1}+X_{m-2}+\cdots+X_{m-n})\cdot Y_m$$

其中，Z 为该次读数的最终计数数值；m 为 m 号稀释度，n 为 n 号平行样； X_{m-n} 代表 m 号稀释度 n 号平行样的读数；Y 代表稀释度系数； Y_m 代表 m 号稀释度系数，并且取 $Y_m \geq Y_{m-1} \geq Y_{m-2} \geq \cdots Y_2 \geq Y_1$ 。

例如某次读数，将 1 号稀释度（小稀释度）所有平行样读取的数字相加，之后乘以 1 号稀释度的系数 1；将 2 号稀释度（中稀释度）所有平行样读取的数字相加，之后乘以 2 号稀释度的系数 2；将 3 号稀释度（大稀释度）所有平行样读取的数字相加，之后乘以 3 号稀释度的系数 3，之后将所有稀释度和平行检测样品乘以系数之后所得的数字相加，得到该次读数的结果。

1 号稀释度（小稀释度）三个平行样分别读为 3-3-2，2 号稀释度（中稀释度）三个平行样分别读为 2-2-1，3 号稀释度（大稀释度）三个平行样分别读为 1-1-0，那么该次读数的结果应计算为 $(3+3+2) \times 1 + (2+2+1) \times 2 + (1+1+0) \times 3 = 24$ 。

7. 将每隔三天读数一次，共计五次读数的结果按照步骤 6 处理，之后将五次读数的结果相加，得到该样品的相对微生物含量结果。

8. 作为对照的常规 MPN 法，只取最后一次，即第 15 天的读数结果，且只记培养液阳性（紫、洋红、红或无色）和培养液阴性（蓝色）。记录之后查 MPN 表求得 MPN 值。

9. 将本发明所述经过上述步骤5到7读数并处理的数据和按照上述步骤8所述读数并处理的数据成图进行对比,结果见图1、2。其中,图1示某海域圈闭采用标准MPN法烃氧化菌检测结果,图2示某海域圈闭采用本发明方法烃氧化菌检测结果。

5 从图1、2可以看出,使用本发明所述方法所得到的结果更加连续,且准确度更高。如使用标准的MPN法测得的四个3.6,使用本发明方法所得到的结果分别为12、7、22、1,显示本发明方法的结果更加连续。在使用本发明在钻井处所得结果为22,这与该钻井为油气井的事实更加相符,显示本发明方法的准确度更高。

10 实施例2

该实施例样品采集于某海域通过钻探证实的油气藏上方,取海洋沉积物对其中的烃氧化菌进行检测,以期研究海域含油气圈闭上方烃氧化菌发育情况。

本发明所述微生物相对含量检测计数的方法具体实施步骤如下:

15 1. 某海域经过钻探证实的油气藏,采取测线的方式布设采样点,采集了23个样品,样品采集间距为500m,采集深度为20cm。样品采集后迅速冷冻,并保持冷冻状态运送到检测实验室,在实验室内储存于冷冻状态下。

2. 称取5g样品置于20mL烃氧化菌培养液中,混匀,制成样品原液。培养液参考U.S. patent 5093236 (Victoria Gonzales-Prevatt,1992)中的实施例。微生物生长指示剂为刃天青。

25 3. 吸取1mL步骤2中的样品原液到9mL灭菌的培养液中,混匀,制成小稀释度培养液。再从小稀释度培养液中取1mL到另一个9mL灭菌的培养液中,混匀,制成中稀释度培养液。再从中稀释度培养液中取1mL到另一个9mL灭菌的培养液中,混匀,制成大稀释度培养液。每种稀释度培养液设置三个平行样,这样,形成三稀释度,每稀释度三平行样的MPN检测体系。

4. 23个样品均按照步骤2和3所述方法设置MPN检测体系。接种完毕后,置于24度培养15天。

5. 15天培养完毕后进行一次读数。读数时观察培养液的颜色,蓝色记为0,紫色记为1,洋红色记为2,红色记为3,无色记为4。

6. 对于第 15 天的读数结果, 按照以下方法进行计算:

将小稀释度所有平行样读取的数字相加, 之后乘以小稀释度的系数 1; 将中稀释度所有平行样读取的数字相加, 之后乘以中稀释度的系数 2; 将大稀释度所有平行样读取的数字相加, 之后乘以大稀释度的系数 3, 之后将所有稀释度和平行检测样品乘以系数之后所得的数字相加, 得到该次读数的结果, 即为该样品的相对微生物含量结果。

1 号稀释度 (小稀释度) 三个平行样分别读为 3-3-2, 2 号稀释度 (中稀释度) 三个平行样分别读为 2-2-1, 3 号稀释度 (大稀释度) 三个平行样分别读为 1-1-0, 那么该次读数的结果应计算为 $(3+3+2) \times 1 + (2+2+1) \times 2 + (1+1+0) \times 3 = 24$

7. 作为对照的常规 MPN 法, 只取最后一次, 即第 15 天的读数结果, 且只记培养液阳性 (紫、洋红、红或无色) 和培养液阴性 (蓝色)。记录之后查 MPN 表求得 MPN 值。

8. 将本发明所述经过上述步骤 5 到 6 读数并处理的数据和按照上述步骤 7 所述读数并处理的数据成图进行对比, 结果见图 3、4。

结果显示, 经过钻探证实, 样品号 7 到 17 所在位置为油气藏区。从本发明方法计数结果和 MPN 法计数结果来看, 本发明方法的计数结果能更好地反映出 7 到 17 号样品之间的油气藏区。MPN 计数法 7、8、10、13、14、15 号样品都处于相对低值, 而本发明上述样品都处于相对高值, 这与实际的情况是相符的。

实施例 3

1. 将分离自海洋的不动杆菌进行活化, 活化步骤为: 先将菌种在海洋烃氧化菌的固体培养进行划线分离, 然后挑取单菌落接种至海洋烃氧化菌液体培养基上进行富集培养。

2. 将富集培养的不动杆菌用无菌水稀释, 制备一系列共 15 种不同浓度的不动杆菌稀释液, 并在显微镜下用血球计数板统计这一系列不同浓度菌液的细胞个数, 可以得到这一系列 15 种不同浓度不动杆菌稀释液的浓度, 用单位个/mL 表示。

- 12 -

3. 吸取 1mL 步骤 2 中不动杆菌液到 9mL 灭菌的培养液中，混匀，制成小稀释度培养液。再从小稀释度培养液中取 1mL 到另一个 9mL 灭菌的培养液中，混匀，制成中稀释度培养液。再从中稀释度培养液中取 1mL 到另一个 9mL 灭菌的培养液中，混匀，制成大稀释度培养液。每种稀释度培养液设置三个平行样，这样，形成三稀释度，每稀释度三平行样的 MPN 检测体系。培养液参考 U.S. patent 5093236 (Victoria Gonzales-Prevatt, 1992) 中的实施例。微生物生长指示剂为刃天青。

4. 15 种不同浓度不动杆菌液均按照步骤 3 所述方法设置 MPN 检测体系。接种完毕后，置于 24 度培养 15 天。

5. 每间隔 3 天进行一次读数。读数时观察培养液的颜色，蓝色记为 0，紫色记为 1，洋红色记为 2，红色记为 3，无色记为 4。

6. 对于每次读数，按照以下公式进行计算：

$$Z = (X_{1-1} + X_{1-2} + \dots + X_{1-n}) * Y_1 + (X_{2-1} + X_{2-2} + \dots + X_{2-n}) * Y_2 + \dots + (X_{m-1} + X_{m-2} + \dots + X_{m-n}) * Y_m$$

其中，Z 为该次读数的最终计数数值；m 为 m 号稀释度，n 为 n 号平行样； X_{m-n} 代表 m 号稀释度 n 号平行样的读数；Y 代表稀释度系数； Y_m 代表 m 号稀释度系数，并且取 $Y_m \geq Y_{m-1} \geq Y_{m-2} \geq \dots \geq Y_2 \geq Y_1$ 。

例如某次读数，将 1 号稀释度（小稀释度）所有平行样读取的数字相加，之后乘以 1 号稀释度的系数 1；将 2 号稀释度（中稀释度）所有平行样读取的数字相加，之后乘以 2 号稀释度的系数 2；将 3 号稀释度（大稀释度）所有平行样读取的数字相加，之后乘以 3 号稀释度的系数 3，之后将所有稀释度和平行检测样品乘以系数之后所得的数字相加，得到该次读数的结果。

1 号稀释度（小稀释度）三个平行样分别读为 3-3-2，2 号稀释度（中稀释度）三个平行样分别读为 2-2-1，3 号稀释度（大稀释度）三个平行样分别读为 1-1-0，那么该次读数的结果应计算为 $(3+3+2) \times 1 + (2+2+1) \times 2 + (1+1+0) \times 3 = 24$

7. 将每隔三天读数一次，共计五次读数的结果按照步骤 6 处理，之后将五次读数的结果相加，得到该样品的相对微生物含量结果。

8. 作为对照的常规 MPN 法，只取最后一次，即第 15 天的读数结果，且

只记培养液阳性（紫、洋红、红或无色）和培养液阴性（蓝色）。记录之后查 MPN 表求得 MPN 值。

同时采用显微计数法对上述样品的不动杆菌进行计数。

9. 15 种不同浓度不动杆菌液显微计数、本发明计数、MPN 法计数的结果对比见表 1、图 5。

表 1 各方法对不动杆菌的计数结果

编号	镜检不动杆菌细胞个数（个/mL）	本发明计数	MPN 法计数（MPN 值/mL）
1	8080000	47	240
2	7272000	46	240
3	6464000	41	240
4	5656000	41	240
5	4848000	32	43
6	4040000	30	43
7	3232000	26	43
8	2424000	10	23
9	1616000	9	9.2
10	808000	7	3.6
11	404000	3	0
12	202000	2	0
13	101000	1	0
14	50500	0	0
15	25250	0	0

从上述图表可以看出，本发明方法得到的结果明显优于MPN法，与镜检得到的不动杆菌细胞数结果更加相符，两者相关系数达到0.9734，而标准的MPN法相关系数只有0.8218。

5

实施例4

该实施例样品采集于某海域通过钻探证实的油气藏上方，取海洋沉积物对其中的烃氧化菌进行检测，以期研究海域含油气圈闭上方烃氧化菌发育情况。

本发明所述微生物相对含量检测计数的方法具体实施步骤如下：

10 1. 某海域经过钻探证实的油气藏，采取测线的方式布设采样点，采集了23个样品，样品采集间距为500m，采集深度为20cm。样品采集后迅速冷冻，并保持冷冻状态运送到检测实验室，在实验室内储存于冷冻状态下。

2. 称取5g样品置于20mL烃氧化菌培养液中，混匀，制成样品原液。培养液参考U.S. patent 5093236 (Victoria Gonzales-Prevatt, 1992)中的实施例。烃氧化菌培养液中微生物生长指示剂为刃天青。调节刃天青的用量，使培养液在15 600纳米波长下吸光度为1.000。

3. 吸取1mL步骤2中的样品原液到9mL灭菌的培养液中，混匀，制成小稀释度培养液。再从小稀释度培养液中取1mL到另一个9mL灭菌的培养液中，混匀，制成中稀释度培养液。再从中稀释度培养液中取1mL到另一个9mL灭菌的培养液中，混匀，制成大稀释度培养液。每种稀释度培养液设置三个平行样，这样，形成三稀释度，每稀释度三平行样的MPN检测体系。20

4. 23个样品均按照步骤2和3所述方法设置MPN检测体系。接种完毕后，置于24度培养15天。

5. 15天培养完毕后进行一次读数。读数时记录培养液对600纳米可见光的吸光度，并用初始吸光度1.000减去培养结束后测得的吸光度，得到吸光度变化值。25

6. 对于第15天的读数结果，按照以下方法进行计算：

将小稀释度所有平行样读取的吸光度变化值相加，之后乘以小稀释度的系数10；将中稀释度所有平行样读取的吸光度变化值相加，之后乘以中稀释度

的系数 20；将大稀释度所有平行样读取的吸光度变化值相加，之后乘以大稀释度的系数 30，之后将所有稀释度和平行检测样品乘以系数之后所得的数字相加，得到该次读数的结果，即为该样品的相对微生物含量结果。

1 号稀释度（小稀释度）三个平行样吸光度变化值分别为
5 0.752-0.733-0.509，2 号稀释度（中稀释度）三个平行样吸光度变化值分别读
为 0.560-0.480-0.376，3 号稀释度（大稀释度）三个平行样吸光度变化值分别
读为 0.224-0.269-0.109，那么该次读数的结果应计算为 $(0.752+0.733+0.509) \times 10 + (0.560+0.480+0.376) \times 20 + (0.224+0.269+0.109) \times 30 = 66.32$

7. 作为对照的常规 MPN 法，只取最后一次，即第 15 天的读数结果，且
10 只记培养液阳性（紫、洋红、红或无色）和培养液阴性（蓝色）。记录之后查 MPN 表求得 MPN 值。

8. 将本发明所述经过上述步骤 5 到 6 读数并处理的数据和按照上述步骤 7 所述读数并处理的数据成图进行对比，结果见图 6、7。

结果显示，经过钻探证实，样品号 7 到 17 所在位置为油气藏区。从本发
15 明方法计数结果和 MPN 法计数结果来看，本发明方法的计数结果能更好地反映出 7 到 17 号样品之间的油气藏区。MPN 计数法 7、8、10、13、14、15 号样品都处于相对低值，而本发明上述样品都处于相对高值，这与实际的情况是相符的。

20 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

权 利 要 求

1、一种微生物相对含量检测计数方法，其特征在于，包括如下步骤：

5 步骤 1：将氧化还原指示剂加入培养基，得到指示培养基；所述氧化还原指示剂的变色范围包括 3 种或 3 种以上肉眼可轻易辨识的颜色；

步骤 2：将待测样本进行稀释，设置 3~15 个稀释度，每个稀释度设置 3~15 个平行，将稀释后的待测样本采用所述指示培养基进行培养；

步骤 3：培养期间和/或培养结束后读取指示培养基的颜色或吸光度；

10 步骤 4：根据指示培养基的颜色变化程度或吸光度变化值，得到待测样本中微生物的相对含量。

2、根据权利要求 1 所述的微生物相对含量检测计数方法，其特征在于，所述氧化还原指示剂为刃天青或甲基蓝。

3、根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的微生物相对含量检测计数方法，其特征在于，步骤 3 为培养结束后读取指示培养基的颜色。

15 4、根据权利要求 3 所述的微生物相对含量检测计数方法，其特征在于，步骤 4 中根据指示培养基的颜色变化程度，得到待测样本中微生物的相对含量为：

根据指示培养基的颜色与微生物含量之间的相关性，对指示培养基的颜色进行读数，所述读数的数字大小与微生物含量呈正相关；

20 采用如下公式获得待测样本中微生物的相对含量：

$$Z = (X_{1-1} + X_{1-2} + \cdots + X_{1-n}) \times Y_1 + (X_{2-1} + X_{2-2} + \cdots + X_{2-n}) \times Y_2 + \cdots + (X_{m-1} + X_{m-2} + \cdots + X_{m-n}) \times Y_m$$

25 其中，Z 为待测样本中微生物的相对含量；m 为 m 号稀释度， $3 \leq m \leq 15$ ；n 为 n 号平行样， $3 \leq n \leq 15$ ；X 为读数值， $X \geq 0$ ； X_{m-n} 代表 m 号稀释度 n 号平行样的读数值；Y 代表稀释度系数， $Y > 0$ ； Y_m 代表 m 号稀释度系数，并且取 $Y_m \geq Y_{m-1} \geq Y_{m-2} \geq \cdots Y_2 \geq Y_1$ 。

5、根据权利要求 1 或 2 所述的微生物相对含量检测计数方法，其特征在于，所述步骤 3 为培养期间和培养结束后读取指示培养基的颜色，所述培养期间和培养结束后读取指示培养基的颜色的次数至少为 2 次。

-17-

6、根据权利要求 5 所述的微生物相对含量检测计数方法，其特征在于，步骤 4 中根据指示培养基的颜色变化程度，得到待测样本中微生物的相对含量为：

根据指示培养基的颜色与微生物含量之间的相关性，将指示培养基的颜色记录为数字，所述数字的大小与微生物含量呈正相关；

采用如下公式获得待测样本一次读数的最终计数数值：

$$Z_i = (X_{1-1} + X_{1-2} + \cdots + X_{1-n}) \times Y_1 + (X_{2-1} + X_{2-2} + \cdots + X_{2-n}) \times Y_2 + \cdots + (X_{m-1} + X_{m-2} + \cdots + X_{m-n}) \times Y_m$$

其中， Z_i 为一次读数的最终计数数值； i 为培养期间和培养结束后读取指示培养基的颜色的次数， $i \geq 2$ ； m 为 m 号稀释度， $3 \leq m \leq 15$ ； n 为 n 号平行样， $3 \leq n \leq 15$ ； X 为读数值， $X \geq 0$ ； X_{m-n} 代表 m 号稀释度 n 号平行样的读数值； Y 代表稀释度系数， $Y > 0$ ； Y_m 代表 m 号稀释度系数，并且取 $Y_m \geq Y_{m-1} \geq Y_{m-2} \geq \cdots Y_2 \geq Y_1$ ；

采用如下公式获得待测样本中微生物的相对含量：

$$Z = Z_1 + \cdots + Z_i$$

其中， Z 为待测样本中微生物的相对含量； Z_i 为一次读数的最终计数数值； i 为培养期间和培养结束后读取指示培养基的颜色的次数， $i \geq 2$ 。

7、根据权利要求 1 或 2 所述的微生物相对含量检测计数方法，其特征在于，所述步骤 3 为培养结束后读取指示培养基的吸光度，步骤 4 中根据指示培养基的吸光度变化值，得到待测样本中微生物的相对含量为：

根据指示培养基的吸光度，采用如下公式获得待测样本中微生物的相对含量：

$$Z = (X_{1-1} + X_{1-2} + \cdots + X_{1-n}) \times Y_1 + (X_{2-1} + X_{2-2} + \cdots + X_{2-n}) \times Y_2 + \cdots + (X_{m-1} + X_{m-2} + \cdots + X_{m-n}) \times Y_m$$

其中， Z 为待测样本中微生物的相对含量； m 为 m 号稀释度， $3 \leq m \leq 15$ ； n 为 n 号平行样， $3 \leq n \leq 15$ ； X 为读取指示培养基的吸光度变化值； X_{m-n} 代表 m 号稀释度 n 号平行样的吸光度变化值； Y 代表稀释度系数， $Y > 0$ ； Y_m 代表 m 号稀释度系数，并且取 $Y_m \geq Y_{m-1} \geq Y_{m-2} \geq \cdots Y_2 \geq Y_1$ 。

8、根据权利要求 1 或 2 所述的微生物相对含量检测计数方法，其特征在

-18-

于, 所述步骤 3 为培养期间和培养结束后读取指示培养基的吸光度, 所述培养期间和培养结束后读取指示培养基的吸光度的次数至少为 2 次。

9、根据权利要求 8 所述的微生物相对含量检测计数方法, 其特征在于, 步骤 4 中根据指示培养基的吸光度变化值, 得到待测样本中微生物的相对含量为:

根据指示培养基的吸光度变化值, 采用如下公式获得待测样本一次读数的最终计数数值:

$$Z_i = (X_{1-1} + X_{1-2} + \cdots + X_{1-n}) \times Y_1 + (X_{2-1} + X_{2-2} + \cdots + X_{2-n}) \times Y_2 + \cdots + (X_{m-1} + X_{m-2} + \cdots + X_{m-n}) \times Y_m$$

10 其中, Z_i 为一次读数的最终计数数值; i 为培养期间和培养结束后读取指示培养基的吸光度的次数, $i \geq 2$; m 为 m 号稀释度, $3 \leq m \leq 15$; n 为 n 号平行样, $3 \leq n \leq 15$; X 为吸光度变化值; X_{m-n} 代表 m 号稀释度 n 号平行样的吸光度变化值; Y 代表稀释度系数, $Y > 0$; Y_m 代表 m 号稀释度系数, 并且取 $Y_m \geq Y_{m-1} \geq Y_{m-2} \geq \cdots Y_2 \geq Y_1$;

15 采用如下公式获得待测样本中微生物的相对含量:

$$Z = Z_1 + \cdots + Z_i$$

其中, Z 为待测样本中微生物的相对含量; Z_i 为一次读数的最终计数数值; i 为培养期间和培养结束后读取指示培养基的吸光度的次数, $i \geq 2$ 。

20 10、根据权利要求 1、2、7 至 9 中任一项所述的微生物相对含量检测计数方法, 其特征在于, 所述吸光度的检测波长为氧化还原指示剂的最大吸收光波长。

—1/4—

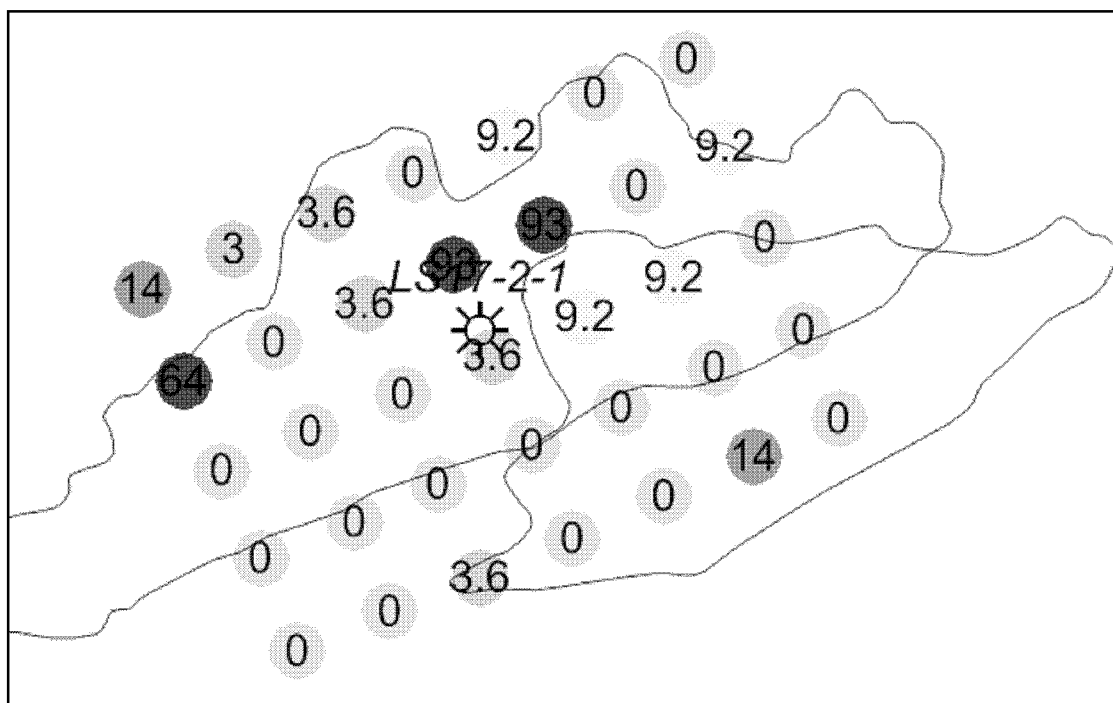


图 1

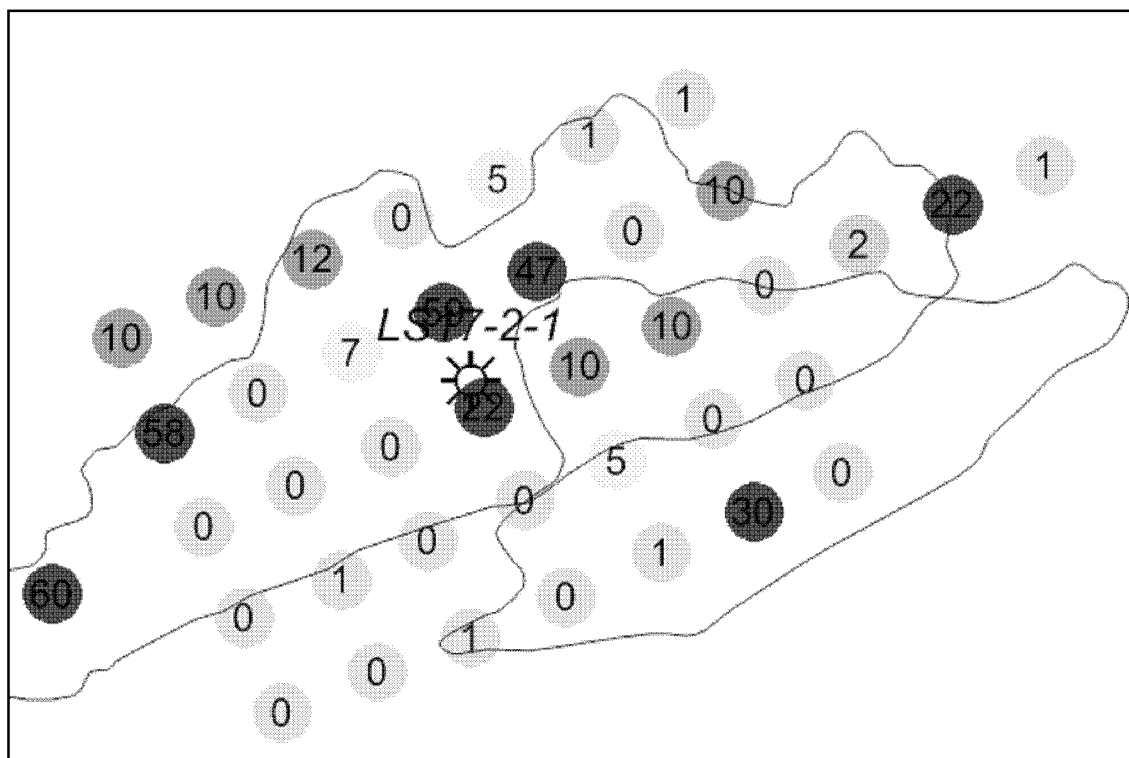


图 2

—2/4—

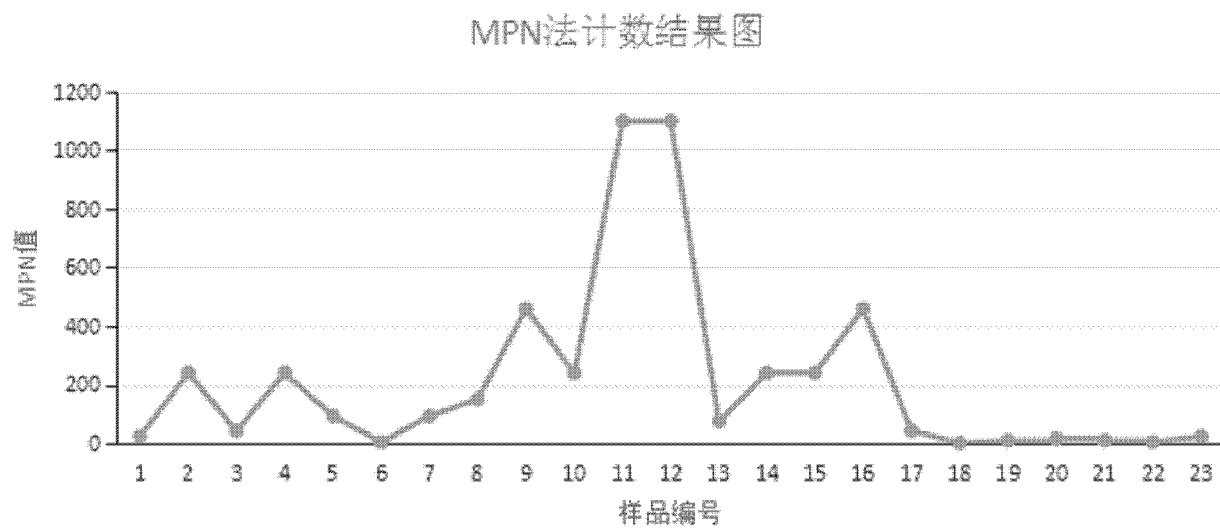


图 3

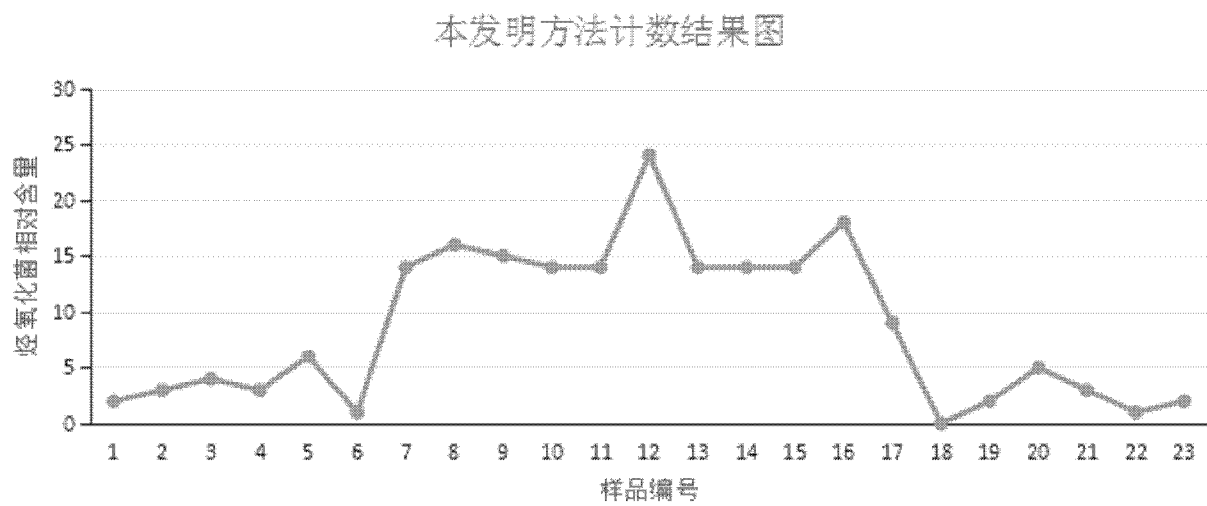


图 4

—3/4—

本发明及MPN法计数结果与不动杆菌镜检结果对比图

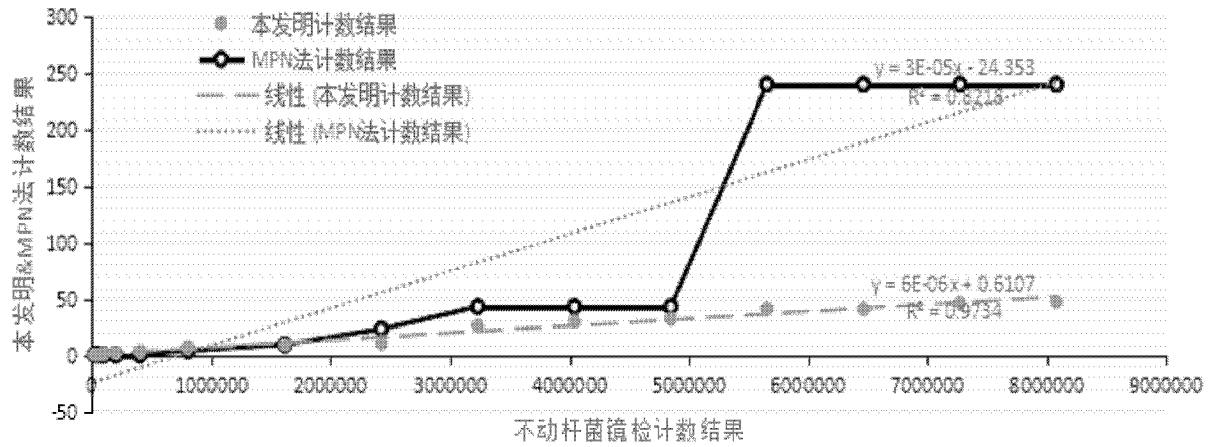


图 5

MPN法计数结果图

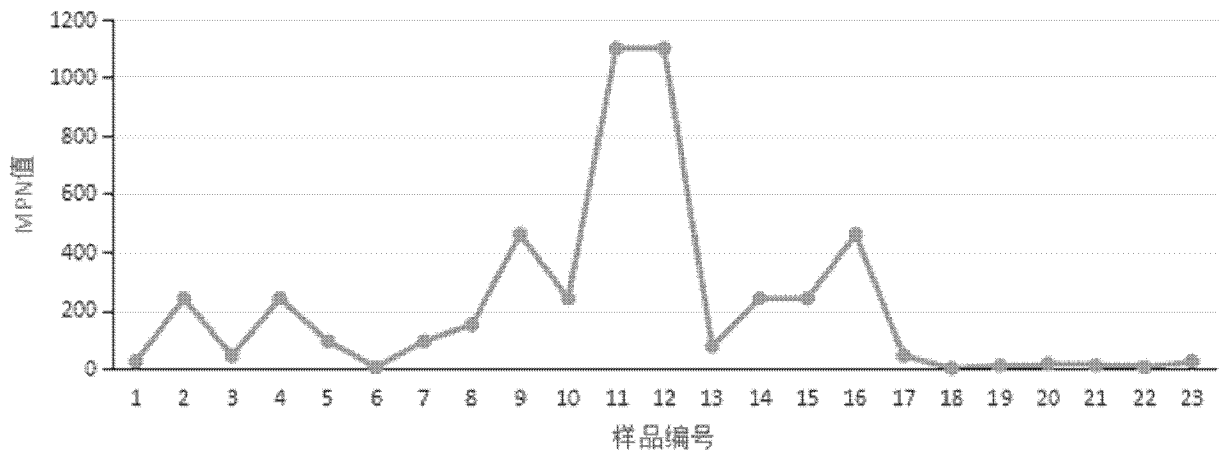


图 6

—4/4—

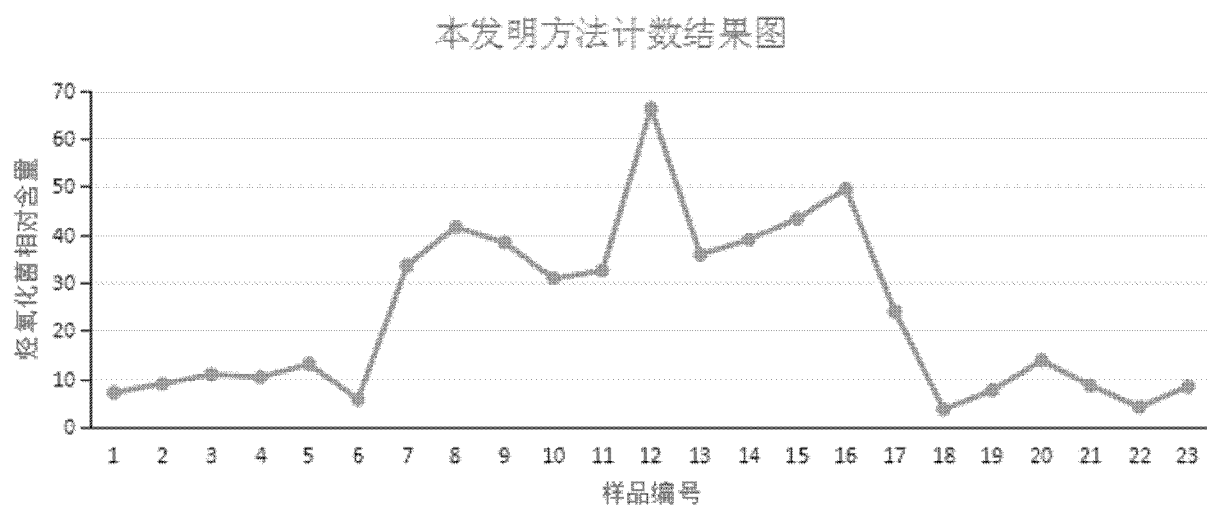


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/075336

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/06 (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)

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)

CNABS, CPRSABS, CNTXT, CSCD, CJFD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED: 计数, 测, 稀释, 指示剂, 刃天青, 甲基蓝, 最大可能数, 最大或然数, 菌, 吸光度, 培养基, 培养, count+, measure+, detection, dilut+, indicator, resazurin, diazoresorcinol, methyl blue, mpn, most probable number, bacteria, absorbance, medium, culture

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102453746 A (CHINA PETROLEUM & CHEMICAL CORPORATION et al.) 16 May 2012 (16.05.2012), see claims 1-10	1-4, 7, 10
Y	CN 102453746 A (CHINA PETROLEUM & CHEMICAL CORPORATION et al.) 16 May 2012 (16.05.2012), see claims 1-10	5, 6, 8, 9
A	CN 103764839 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE et al.) 30 April 2014 (30.04.2014), see entire document	1-10
A	CN 103575710 A (JOHNSON & JOHNSON VISION CARE) 12 February 2014 (12.02.2014), see entire document	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“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
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 12 September 2017	Date of mailing of the international search report 13 October 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer PAN, Junyu Telephone No. (86-10) 62089155

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2017/075336

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 8026093 B2 (UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 27 September 2011 (27.09.2011), see entire document	1-10
Y	Carmen MATEESCU et al. Comparative Analysis of Inoculum Biomass for Biogas Potential in the Anaerobic Digestion. U. P. B. Scientific Bulletin. 31 December 2011 (31.12.2011), 73(3), ISSN: 1454-2331, pp. 99-104, see pp. 100-102	5, 6, 8, 9
Y	LEORA A. SHELEF et al. Rapid Optical Measurements of Microbial Contamination in Raw Ground Beef and Effects of Citrate and Lactate. Journal of Food Protection. 30 June 1997 (30.06.1997), 60(6), ISSN: 0362-028X, pp. 673-676, see pp. 674 and 675	5, 6, 8, 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/075336

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102453746 A	16 May 2012	CN 102453746 B	06 November 2013
CN 103764839 A	30 April 2014	US 9556469 B2	31 January 2017
		FR 2976952 A1	28 December 2012
		EP 2723885 B1	12 August 2015
		CN 103764839 B	29 March 2017
		WO 2013001465 A3	28 March 2013
		WO 2013001465 A2	03 January 2013
		EP 2723885 A2	30 April 2014
		US 2014162301 A1	12 June 2014
CN 103575710 A	12 February 2014	US 9244013 B2	26 January 2016
		BR 102013016806 A2	25 August 2015
		IL 227203 D0	31 March 2014
		EP 2679248 B1	09 August 2017
		CA 2819987 A1	29 December 2013
		RU 2578452 C2	27 March 2016
		AU 2013206574 B2	28 April 2016
		TW 201406412 A	16 February 2014
		EP 2679248 A1	01 January 2014
		KR 20140002565 A	08 January 2014
		RU 2013129856 A	10 January 2015
		TW I580445 B	01 May 2017
		JP 6180821 B2	16 August 2017
		JP 2014014674 A	30 January 2014
		US 2014004609 A1	02 January 2014
		AU 2013206574 A1	16 January 2014
US 8026093 B2	27 September 2011	US 2010120026 A1	13 May 2010

A. 主题的分类 C12Q 1/06 (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) 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)) CNABS, CPRSABS, CNTXT, CSCD, CJFD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CA-TXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, WEB OF SCIEN-CE, PUBMED; 计数, 测, 稀释, 指示剂, 刃天青, 甲基蓝, 最大可能数, 最大或然数, 菌, 吸光度, 培养基, 培养, count+, measure+, detection, dilut+, indicator, resazurin, diazoresorcinal, methyl blue, mpn, most probable number, bacteria, absorbance, medium, culture		
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 102453746 A (中国石油化工股份有限公司等) 2012年 5月 16日 (2012 - 05 - 16) 参见权利要求1-10	1-4, 7, 10
Y	CN 102453746 A (中国石油化工股份有限公司等) 2012年 5月 16日 (2012 - 05 - 16) 参见权利要求1-10	5-6, 8-9
A	CN 103764839 A (原子能与替代能源委员会等) 2014年 4月 30日 (2014 - 04 - 30) 参见全文	1-10
A	CN 103575710 A (庄臣及庄臣视力保护公司) 2014年 2月 12日 (2014 - 02 - 12) 参见全文	1-10
A	US 8026093 B2 (UNIV CALIFORNIA) 2011年 9月 27日 (2011 - 09 - 27) 参见全文	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 “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		国际检索报告邮寄日期
2017年 9月 12日		2017年 10月 13日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		潘俊宇 电话号码 (86-10)62089155

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
Y	Carmen MATEESCU等. "COMPARATIVE ANALYSIS OF INOCULUM BIOMASS FOR BIOGAS POTENTIAL IN THE ANAEROBIC DIGESTION" U.P.B. Scientific Bulletin, 第73卷, 第3期, 2011年 12月 31日 (2011 - 12 - 31), ISSN: 1454-2331, 第99-104页, 参见第100-102页	5-6, 8-9
Y	LEORA A. SHELEF等. "Rapid Optical Measurements of Microbial Contamination in Raw Ground Beef and Effects of Citrate and Lactate" Journal of Food Protection, 第60卷, 第6期, 1997年 6月 30日 (1997 - 06 - 30), ISSN: 0362-028X, 第673-676页, 参见第674-675页	5-6, 8-9

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/075336

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	102453746	A	2012年 5月 16日	CN	102453746	B	2013年 11月 6日
CN	103764839	A	2014年 4月 30日	US	9556469	B2	2017年 1月 31日
				FR	2976952	A1	2012年 12月 28日
				EP	2723885	B1	2015年 8月 12日
				CN	103764839	B	2017年 3月 29日
				WO	2013001465	A3	2013年 3月 28日
				WO	2013001465	A2	2013年 1月 3日
				EP	2723885	A2	2014年 4月 30日
				US	2014162301	A1	2014年 6月 12日
CN	103575710	A	2014年 2月 12日	US	9244013	B2	2016年 1月 26日
				BR	102013016806	A2	2015年 8月 25日
				IL	227203	D0	2014年 3月 31日
				EP	2679248	B1	2017年 8月 9日
				CA	2819987	A1	2013年 12月 29日
				RU	2578452	C2	2016年 3月 27日
				AU	2013206574	B2	2016年 4月 28日
				TW	201406412	A	2014年 2月 16日
				EP	2679248	A1	2014年 1月 1日
				KR	20140002565	A	2014年 1月 8日
				RU	2013129856	A	2015年 1月 10日
				TW	1580445	B	2017年 5月 1日
				JP	6180821	B2	2017年 8月 16日
				JP	2014014674	A	2014年 1月 30日
				US	2014004609	A1	2014年 1月 2日
				AU	2013206574	A1	2014年 1月 16日
US	8026093	B2	2011年 9月 27日	US	2010120026	A1	2010年 5月 13日