

(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
2017 年 1 月 26 日 (26.01.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/012569 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 1/20 (2006.01) C12R 1/11 (2006.01)
C02F 3/34 (2006.01) C12R 1/07 (2006.01)
C12R 1/125 (2006.01) C12R 1/085 (2006.01)
C12R 1/10 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/090894

(22) 国际申请日: 2016 年 7 月 21 日 (21.07.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201510436128.7 2015 年 7 月 22 日 (22.07.2015) CN

(71) 申请人: 江南大学 (JIANGNAN UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张梁, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 张梁 (ZHANG, Liang); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 无锡华源专利商标事务所 (普通合伙) (WUXI HUAYUAN PATENT AND TRADEMARK AGENCY (GENERAL PARTNERSHIP)); 中国江苏省无锡市滨湖区建筑路 599 号国家工业设计园 4 号楼 1216 室聂启新, Jiangsu 214072 (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, 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, KN, KP, KR, 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)。

根据细则 4.17 的声明:

— 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
— 包括按细则 13 之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则 13 之二.4(d)(i)和 48.2(a)(viii))。

(54) Title: BACILLUS COMBINED WATER-PURIFYING AGENT FOR PET FISH AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 用于观赏鱼的芽孢杆菌复合净水剂及其应用方法

(57) Abstract: Provided is a *Bacillus* combined water-purifying agent for a pet fish, comprising the following species: a *Bacillus subtilis* (CCTCC No. M2011443), a *Bacillus licheniformis* (CCTCC No. M2012457), a *Bacillus coagulans* (CCTCC No. M2015273), a *Bacillus pumilus*, a *Bacillus megaterium*, a *Bacillus amyloliquefaciens*, a *Brevibacillus laterosporus*, and a *Bacillus cereus*.

(57) 摘要: 提供了一种应用于观赏鱼的芽孢杆菌复合净水剂, 由以下菌种组成: 枯草芽孢杆菌 CCTCC NO: M2011443、地衣芽孢杆菌 CCTCC NO: M2012457、凝结芽孢杆菌 CCTCC NO: M2015273、短小芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、侧孢芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌。



WO 2017/012569 A1

用于观赏鱼的芽孢杆菌复合净水剂及其应用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物应用技术领域，尤其是涉及一种应用于观赏鱼的、含有凝结芽孢杆菌复合芽孢杆菌微生物净水剂及其应用。

背景技术

[0002] 随着生活水平不断提高，观赏鱼已进入日常生活，给人们带来欢乐。家庭养鱼过程中，水体经常出现浑浊甚至发绿发黑等现象，严重时直接导致观赏鱼死亡。引起这种现象的原因在于未被食用的饵料和观赏鱼排泄物污染了水体。

[0003] 目前，人们通常采用定期更换新鲜水或者使用含有光合细菌（PSB）的微生物净水剂产品来保持水体干净。

[0004] 定期更换新鲜水固然能维持观赏鱼养殖水质，但替换出的脏水会被排入下水道或者进入环境，形成新的污染源。

[0005] PSB是一类光能厌氧性微生物，能以污水中的有机物为营养进行光合作用，从而净化水质。农林生介绍了一种以光合菌群为主的复合微生物净水剂在观赏鱼养殖中的有益效果（复合微生物净水剂对观赏鱼水族箱养殖水质的影响试验，广西农业科学，2008年第39卷第6期）。PSB有一个缺点，即保质期不长，出厂后短期内必须用完，否则微生物大量死亡。因此，在使用含有光合细菌（PSB）的微生物净水剂产品时，经常会发现产品前期有效，但过了两三个月以后效果减弱甚至没有效果。

技术问题

[0006] 针对现有技术存在的上述问题，本申请人提供了一种应用于观赏鱼的、含有凝结芽孢杆菌的复合芽孢杆菌微生物净水剂及其应用。本发明可降解观赏鱼养殖水体中的底部残饵和排泄物，实现净化水体，节省换水人工并减少换水带来的环境污染问题；产品保质期1年，利于日常采购和使用。

问题的解决方案

技术解决方案

[0007] 本发明的技术方案如下：

[0008] 本发明提供了一种应用于观赏鱼的复合芽孢杆菌微生物净水剂，由以下菌种组成：

[0009]	名称	含量
[0010]	枯草芽孢杆菌CCTCC NO: M2011443	$1.0 \times 10^7 - 3.0 \times 10^9$ cfu/g
[0011]	地衣芽孢杆菌CCTCC NO: M2012457	$1.0 \times 10^7 - 1.5 \times 10^9$ cfu/g
[0012]	凝结芽孢杆菌CCTCC NO: M2015273	$0.5 \times 10^7 - 1.0 \times 10^9$ cfu/g
[0013]	短小芽孢杆菌	$0.1 \times 10^7 - 0.5 \times 10^9$ cfu/g
[0014]	巨大芽孢杆菌	$0.4 \times 10^7 - 1.0 \times 10^9$ cfu/g
[0015]	解淀粉芽孢杆菌	$0.5 \times 10^7 - 1.0 \times 10^9$ cfu/g
[0016]	侧孢芽孢杆菌	$1.0 \times 10^7 - 1.0 \times 10^9$ cfu/g
[0017]	蜡样芽孢杆菌	$0.5 \times 10^7 - 1.0 \times 10^9$ cfu/g
[0018]	合计	$5.0 \times 10^7 - 1.0 \times 10^{10}$ cfu/g;

[0019] 所述凝结芽孢杆菌为凝结芽孢杆菌（*Bacillus coagulans*）ZS-007，保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为CCTCC NO: M 2015273。

[0020] 本发明还提供了一种应用于观赏鱼的复合芽孢杆菌微生物净水剂的应用方法，将复合芽孢杆菌微生物净水剂直接投入水体，用量 $0.1 - 0.5 \text{g/m}^3$ 水体，每8~12天使用一次。

[0021] 1、凝结芽孢杆菌的筛选

[0022] 从江苏无锡马山某奶牛养殖场附近的土壤样品称取2g，加入98ml无菌生理盐水，80℃热处理10min后，在37℃摇床上120 rpm条件下振荡20min，吸取上清液1ml加入LB培养基中稀释涂布进行菌株分离。通过对菌株进行形态学观察、生理生化实验、16S rDNA分析等手段有效而准确的确定菌种的属种。

[0023] 最终得到编号为ZS-007的菌种，鉴定为凝结芽孢杆菌（*Bacillus coagulans*）。

[0024] ZS-007于2015年5月3日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为CCTCC M 2015273。

[0025] 2、凝结芽孢杆菌高密度发酵

[0026] (1) 菌种活化

[0027] 将凝结芽孢杆菌菌种接种至营养琼脂斜面培养基上，25-37°C下培养24-48hr；然后划线转接于营养琼脂茄子瓶斜面，25-37°C下培养24-48hr。

[0028] 营养琼脂斜面培养基及营养琼脂茄子瓶的组成均为：蛋白胨 10g/L，牛肉膏 3g/L，氯化钠 5g/L，琼脂 15-20g/L，pH7.2-7.4。

[0029] (2) 摇瓶培养

[0030] 将活化好的菌种接种至摇瓶中，振荡培养18-30hr。

[0031] 摇瓶培养基配方：蛋白胨 10g/L，牛肉膏 3g/L，氯化钠 5g/L，pH7.2-7.4。250mL摇瓶装液量为20mL，500mL摇瓶装液量为50mL。

[0032] 培养条件：摇瓶转速200r/min，温度25-37°C。

[0033] (3) 种子罐扩培

[0034] 扩培菌种以用于后期发酵。种子罐培养基组成：蛋白胨 10g/L，牛肉膏 3g/L，氯化钠 5g/L，pH7.2-7.4。种子罐体积10-1000L，装液量50-80%。

[0035] 培养条件：搅拌转速180-250r/min，通气量0.5-1.0vvm，温度25-37°C，培养时间18-30hr。

[0036] (4) 发酵罐发酵

[0037] 以0.1%-10%的接种量将种子液接入发酵罐，发酵培养基组成：葡萄糖25 g/L，蛋白胨15 g/L，酵母粉10 g/L，磷酸二氢钾1 g/L，硫酸镁0.5 g/L，初始pH7.0。发酵罐体积1-50m³，装液量50-80%。

[0038] 培养条件：搅拌转速100-200r/min，通气量0.5-0.8vvm，温度25-37°C，培养时间16-48hr。

[0039] 取发酵液镜检时，当90%以上的菌体都形成芽孢时，即到发酵终点，得到最终发酵液。

[0040] 采用平板涂布法测定最终发酵液活菌数和芽孢数，并计算芽孢率。其中，芽孢率为芽孢数与活菌数的比值。所用培养基为营养琼脂培养基：蛋白胨 10g/L，牛肉膏 3g/L，氯化钠 5g/L，琼脂 15-20g/L，pH7.2-7.4。测定最终发酵液活菌数时，梯度稀释后测定；测定芽孢数时，取最终发酵液于80°C热处理10min，梯度稀释后测定。最终发酵液中活菌数 1.5×10^{10} cfu/mL以上、芽孢数 1.4×10^{10} cfu/mL以

上、芽孢率90.8%以上。

[0041] 3、凝结芽孢杆菌干菌粉制备

[0042] 最终发酵液离心后收集湿菌泥，采用喷雾干燥工艺得到干菌粉。操作条件为：进风温度210℃，出风温度100℃。干菌粉中活菌数 8.0×10^{11} cfu/g以上。

[0043] 本发明的实现方式：将枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、侧孢芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌进行复配得到复合芽孢杆菌微生物净水剂产品。该复合芽孢杆菌微生物净水剂产品直投式使用，用量0.1-0.5g产品/m³水体，每8-12天使用一次。产品保质期1年。

发明的有益效果

有益效果

[0044] 本发明有益的技术效果在于：

[0045] 本发明的作用原理：（1）多种芽孢杆菌发挥协同作用，多余饵料和观赏鱼排泄物用作微生物繁殖所需的营养物质而被大量消耗；（2）微生物代谢产生很多酶类，有效去除水体中的氨氮、亚硝酸盐等不利因素；（3）形成的微生物菌体聚合物可充当观赏鱼饵料，直接被吞食；（4）微生物以芽孢状态存在，抗逆性强，产品保质期长。

[0046] 本发明直接投放于观赏鱼养殖水体进行水质改良，有效解决换水带来的环境污染问题；本发明实现了水质稳定，延长换水周期甚至可不换水；同时，产品保质期长达1年，便于日常采购和使用。

发明实施例

本发明的实施方式

[0047] 实施例1

[0048] 1、凝结芽孢杆菌的筛选

[0049] 从江苏无锡马山某奶牛养殖场附近的土壤样品称取2g，加入98ml无菌生理盐水，80℃热处理10min后，在37℃摇床上120 rpm条件下振荡20min，吸取上清液1ml加入LB培养基中稀释涂布进行菌株分离。通过对菌株进行形态学观察、生理生化实验、16S rDNA分析等手段有效而准确的确定菌种的属种。

[0050] 最终得到编号为ZS-007的菌种，鉴定为凝结芽孢杆菌（*Bacillus coagulans*）。

[0051] ZS-007于2015年5月3日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为CCTCC M 2015273。

[0052] 2、30m³发酵罐制备

[0053] 菌种活化：将得到的菌种接种至营养琼脂斜面培养基上，30℃下培养24hr后划线转接于营养琼脂茄子瓶斜面，30℃下培养24hr。营养琼脂斜面培养基及营养琼脂茄子瓶的组成均为：蛋白胨 10g/L，牛肉膏 3g/L，氯化钠 5g/L，琼脂 15-20g/L，pH7.2-7.4。

[0054] 摇瓶培养：将活化好的菌种接种至摇瓶中，振荡培养20hr。摇瓶培养基配方：蛋白胨 10g/L，牛肉膏 3g/L，氯化钠 5g/L，pH7.2-7.4，摇瓶装液量50mL/500mL三角瓶。培养条件：摇瓶转速200r/min，温度30℃。

[0055] 种子罐扩培：收集20瓶500mL摇瓶种子液用于种子罐接种。种子罐培养基组成：蛋白胨 10g/L，牛肉膏 3g/L，氯化钠 5g/L，pH7.2-7.4。种子罐体积500L，装液量75%。培养条件：搅拌转速200r/min，通气量0.8vvm，温度30℃，培养时间20hr。

[0056] 发酵罐发酵：30m³发酵罐装液量70%。培养基组成：葡萄糖25 g/L，蛋白胨15 g/L，酵母粉10 g/L，磷酸二氢钾1 g/L，硫酸镁0.5 g/L，初始pH7.0。将培养好的种子接入发酵罐进行发酵。培养条件：搅拌转速100r/min，通气量0.6vvm，温度35℃，培养时间40-45hr。

[0057] 发酵液中，活菌数 1.99×10^{10} cfu/g，芽孢数 1.92×10^{10} cfu/g，芽孢率96.5%。

[0058] 3、干菌粉制备

[0059] 离心收集湿菌泥，采用喷雾干燥工艺得到干菌粉。操作条件为：进风温度210℃，出风温度100℃。干菌粉中活菌数 8.32×10^{11} cfu/g。

[0060]

[0061] 实施例2

[0062] 本复合芽孢杆菌微生物净水剂中各微生物含量如表1：

[0063] 表1

[]

[表1]

名称	含量
枯草芽孢杆菌CCTCC NO: M2011443	1.0×10^7 cfu/g
地衣芽孢杆菌CCTCC NO: M2012457	1.0×10^7 cfu/g
凝结芽孢杆菌CCTCC NO: M2015273	0.5×10^7 cfu/g
短小芽孢杆菌	0.1×10^7 cfu/g
巨大芽孢杆菌	0.4×10^7 cfu/g
解淀粉芽孢杆菌	0.5×10^7 cfu/g
侧孢芽孢杆菌	1.0×10^7 cfu/g
蜡样芽孢杆菌	0.5×10^7 cfu/g
合计	5.0×10^7 cfu/g

[0064] 其中，枯草芽孢杆菌CCTCC NO: 2011443、地衣芽孢杆菌CCTCC NO: 2012457购买于中国典型培养物保藏中心；凝结芽孢杆菌CCTCC NO:M2015273为实施例1所制备。短小芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、侧孢芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌为市售产品。

[0065] 应用时，产品直接投放于观赏鱼缸内，用量 $0.2\text{g}/\text{m}^3$ 水体，每10天使用一次。同时进行对照试验，在另外一个同规格、观赏鱼数量和大小一致的鱼缸中，使用不含有凝结芽孢杆菌CCTCC NO: M2015273的产品。两个缸均正常喂食。

[0066] 不含有凝结芽孢杆菌CCTCC NO: M2015273的芽孢杆菌微生物净水剂，鱼缸在前1个月内可不换水，水质较为干净；从第二个月开始，鱼缸底部有排泄物沉淀出现，水质逐渐变浑浊。不到第三个月，鱼出现浮头现象，不得不换水。

[0067] 含有凝结芽孢杆菌CCTCC NO: M2015273的芽孢杆菌微生物净水剂，鱼缸4个月内未换水，水质干净，底部未见饵料、排泄物沉淀，鱼未出现死亡现象。期间，主要水质指标变化情况如表2所示，污染因子指标下降，水质稳定。

[0068] 表2

[]

[表2]

	0 (产品投放前)	1个月	2个月	3个月	4个月
COD(mg/L)	10.5	8.9	9.2	9.0	8.7
氨氮(mg/L)	1.53	1.41	1.37	1.29	1.27
亚硝酸盐(mg/L)	0.28	0.21	0.19	0.18	0.16

[0069]

[0070] 实施例3

[0071] 按实施例1中的复合芽孢杆菌微生物净水剂室温下放置1年后再使用，产品直接投放于观赏鱼缸内，用量 $0.2\text{g}/\text{m}^3$ 水体，每10天使用一次。

[0072] 正常喂食，鱼缸4个月内未换水，水质干净，底部未见饵料、排泄物沉淀，鱼未出现死亡现象。

[0073]

[0074] 实施例4

[0075] 复合芽孢杆菌微生物净水剂中各微生物含量如表3:

[0076] 表3

[]

[表3]

名称	含量
枯草芽孢杆菌CCTCC NO: M2011443	5.0×10^7 cfu/g
地衣芽孢杆菌CCTCC NO: M2012457	4.0×10^7 cfu/g
凝结芽孢杆菌CCTCC NO: M2015273	1.0×10^7 cfu/g
短小芽孢杆菌	5.0×10^7 cfu/g
巨大芽孢杆菌	2.0×10^7 cfu/g
解淀粉芽孢杆菌	2.0×10^7 cfu/g
侧孢芽孢杆菌	4.0×10^7 cfu/g
蜡样芽孢杆菌	2.0×10^7 cfu/g
合计	2.5×10^8 cfu/g

[0077] 应用时，产品直接投放于观赏鱼缸内，用量 $0.1\text{g}/\text{m}^3$ 水体，每10天使用一次。正常喂食，鱼缸一年内未换水，水质常年保持清亮，底部干净，鱼未出现死亡现象。

[0078]

[0079] 实施例5

[0080] 复合芽孢杆菌微生物净水剂中各微生物含量如表4:

[0081] 表4

[]

[表4]

名称	含量
枯草芽孢杆菌CCTCC NO: M2011443	2.0×10^9 cfu/g
地衣芽孢杆菌CCTCC NO: M2012457	1.0×10^9 cfu/g
凝结芽孢杆菌CCTCC NO: M2015273	1.0×10^9 cfu/g
短小芽孢杆菌	0.5×10^9 cfu/g
巨大芽孢杆菌	1.0×10^9 cfu/g
解淀粉芽孢杆菌	1.0×10^9 cfu/g
侧孢芽孢杆菌	1.0×10^9 cfu/g
蜡样芽孢杆菌	1.0×10^9 cfu/g
合计	8.5×10^9 cfu/g

[0082] 应用时，产品直接投放于观赏鱼缸内，用量 $0.1\text{g}/\text{m}^3$ 水体，每10天使用一次。正常喂食，鱼缸一年内未换水，水质常年保持清亮，底部干净，鱼未出现死亡现象。

[0083] 对于本领域技术人员来说，可以根据上述说明加以改进或变换，这些改进或变换都属于本发明所附权利要求的保护范围。

PCT

打印件(原件为电子形式)

0-1	PCT/RO/134表(SAFE)有关保藏的微生物或其他生物材料的说明(PCT细则第13条之二)	
0-1-1	软件版本	CEPCT 版本 1.01.00 MT/FOP 20140331/0.20.5.21
0-2	国际申请号	PCT/CN2016/090894
0-3	申请人或代理人的档案号	HY0081

1	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
1-1	页码	0024
1-2	行号:	1-2
1-3	保藏事项	
1-3-1	保藏单位名称	中国典型培养物保藏中心
1-3-2	保藏单位地址	中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码: 430072, Hubei (CN) 。
1-3-3	保藏日期	2015年 5月 03日 (03.05.2015)
1-3-4	保藏号	CCTCC M2015273
1-4	补充说明	
1-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
1-6	单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局	

由受理局填写

0-4	本表格与国际申请一起收到: (是或否)	
0-4-1	授权官员	

由国际局填写

0-5	国际局收到本表格日期:	
0-5-1	授权官员	

权利要求书

[权利要求 1] 一种应用于观赏鱼的复合芽孢杆菌微生物净水剂，其特征在于由以下菌种组成：

名称	含量
枯草芽孢杆菌CCTCC NO: M2011443	$1.0 \times 10^7 - 3.0 \times 10^9$ cfu/g
地衣芽孢杆菌CCTCC NO: M2012457	$1.0 \times 10^7 - 1.5 \times 10^9$ cfu/g
凝结芽孢杆菌CCTCC NO: M2015273	$0.5 \times 10^7 - 1.0 \times 10^9$ cfu/g
短小芽孢杆菌	$0.1 \times 10^7 - 0.5 \times 10^9$ cfu/g
巨大芽孢杆菌	$0.4 \times 10^7 - 1.0 \times 10^9$ cfu/g
解淀粉芽孢杆菌	$0.5 \times 10^7 - 1.0 \times 10^9$ cfu/g
侧孢芽孢杆菌	$1.0 \times 10^7 - 1.0 \times 10^9$ cfu/g
蜡样芽孢杆菌	$0.5 \times 10^7 - 1.0 \times 10^9$ cfu/g
合计	$5.0 \times 10^7 - 1.0 \times 10^{10}$ cfu/g;

所述凝结芽孢杆菌为凝结芽孢杆菌（*Bacillus coagulans*）ZS-007，保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为CCTCC NO: M2015273。

[权利要求 2] 一种权利要求1所述的应用于观赏鱼的复合芽孢杆菌微生物净水剂的应用方法，其特征在于将复合芽孢杆菌微生物净水剂直接投入水体，用量 $0.1 - 0.5 \text{ g/m}^3$ 水体，每8~12天使用一次。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/090894

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20 (2006.01) i; C02F 3/34 (2006.01) i; C12R 1/125 (2006.01) n; C12R 1/10 (2006.01) n; C12R 1/11 (2006.01) n; C12R 1/07 (2006.01) n; C12R 1/085 (2006.01) n

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)

C12N; C02F; C12R

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)

Database: CPRSABS, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, CNKI, PubMed

Key Words: spectacular fish, aquarium fish, fish, bacillus, purifier, water clarifying agent, water purification agent, water purification, search carried on the names of assignee and inventor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 105132307 A (JIANGNAN UNIVERSITY; LSY BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 09 December 2015 (09.12.2015), see abstract, and claims 1-2	1-2
Y	CN 104017757 A (JIANGNAN UNIVERSITY; TAIZHOU LVSHENGYUAN BIOLOGICAL CO., LTD.; LSY BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 03 September 2014 (03.09.2014), see abstract, claims 1-7, and description, page 3, paragraph [0019]	1-2
Y	ZHAO, Debing et al., "The Effect Comparison of Several Purifying Agentson Water Quality", MODERN AGRICULTURAL SCIENCES, volume 15, number 7, 31 July 2008 (31.07.2008), ISSN: 1005-4650, see abstract, page 48, left column, penultimate paragraphs and right column, last paragraph	1-2
A	KR 100819869 B1 (DSK ENGINEERING CO., LTD. et al.), 08 April 2008 (08.04.2008), see the whole document	1-2
A	CN 101333499 A (KUNSHAN INDUSTRY TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE, HUAKE INSTITUTE OF BIO-POLYMERIC MATERIALS CO., LTD.), 31 December 2008 (31.12.2008), see the whole document	1-2

☒ 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	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 03 September 2016 (03.09.2016)	Date of mailing of the international search report 14 September 2016 (14.09.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: 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 YU, Ting Telephone No.: (86-10) 010-62089322

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/090894

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102219310 (WUHAN IN AO TIAN YUE BIOLOG TECHNOLOGY CO., LTD.), 19 October 2011 (19.10.2011), see the whole document	1-2

International application No.
PCT/CN2016/090894

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/090894

A. 主题的分类

C12N 1/20(2006.01)i; C02F 3/34(2006.01)i; C12R 1/125(2006.01)n; C12R 1/10(2006.01)n; C12R 1/11(2006.01)n; C12R 1/07(2006.01)n; C12R 1/085(2006.01)n

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)

C12N; C02F; C12R

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: CPRSABS, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, CNKI, PubMed 关键词: 观赏鱼, 鱼, 芽孢杆菌, 净水剂, 净水, spectacular fish, aquarium fish, fish, bacillus, purifier, water clarifying agent, water purification agent, water purification, 对申请人和发明人的名称进行检索

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
PX	CN 105132307 A (江南大学, 江苏大有生物科技发展有限公司) 2015年 12月 9日 (2015 - 12 - 09) 参见摘要, 权利要求1-2	1-2
Y	CN 104017757 A (江南大学, 泰州绿圣元生物科技有限公司, 江苏大有生物科技发展有限公司) 2014年 9月 3日 (2014 - 09 - 03) 参见摘要和权利要求1-7, 说明书第3页第[0019]段	1-2
Y	赵德炳等. "几种净水剂净化水质效果比较" 现代农业科学, 第15卷, 第7期, 2008年 7月 31日 (2008 - 07 - 31), ISSN: 1005-4650, 参见摘要, 第48页左栏倒数第2段和右栏最后一段	1-2
A	KR 100819869 B1 (DSK ENGINEERING CO LTD等) 2008年 4月 8日 (2008 - 04 - 08) 参见全文	1-2
A	CN 101333499 A (昆山工研院华科生物高分子材料研究所有限公司) 2008年 12月 31日 (2008 - 12 - 31) 参见全文	1-2

☒ 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

2016年 9月 3日

国际检索报告邮寄日期

2016年 9月 14日

ISA/CN的名称和邮寄地址

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

授权官员

于婷

电话号码 (86-10) 010-62089322

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
A	CN 102219310 A (武汉中傲天乐生物科技有限公司) 2011年 10月 19日 (2011 - 10 - 19) 参见全文	1-2

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/090894

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	105132307	A	2015年 12月 9日	无			
CN	104017757	A	2014年 9月 3日	WO	2015184935	A1	2015年 12月 10日
				CN	104017757	B	2016年 5月 18日
KR	100819869	B1	2008年 4月 8日	无			
CN	101333499	A	2008年 12月 31日	CN	101333499	B	2010年 6月 9日
CN	102219310	A	2011年 10月 19日	CN	102219310	B	2013年 6月 19日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)