

(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
2016 年 2 月 11 日 (11.02.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/019572 A1

- (51) 国际专利分类号:
A01K 63/04 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/083985
- (22) 国际申请日: 2014 年 8 月 8 日 (08.08.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 浙江大学 (ZHEJIANG UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号阮贇杰, Zhejiang 310027 (CN)。
- (72) 发明人: 阮贇杰 (RUAN, Yunjie); 中国浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号阮贇杰, Zhejiang 310027 (CN)。朱松明 (ZHU, Songming); 中国浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号阮贇杰, Zhejiang 310027 (CN)。
- (74) 代理人: 杭州求是专利事务所有限公司 (HANGZHOU QIUSHI PATENT OFFICE CO., LTD); 中国浙江省杭州市西湖区玉古路 147 号黄鸿年科技综合大楼 215 室林松海, Zhejiang 310027 (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, LT, 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, 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: MRNA RESPONSE-BASED VARIABLE FLOW CONTROL METHOD AND SYSTEM FOR RECIRCULATING AQUACULTURE SYSTEM

(54) 发明名称: 基于 mRNA 响应的循环水养殖系统变速流控制方法及系统

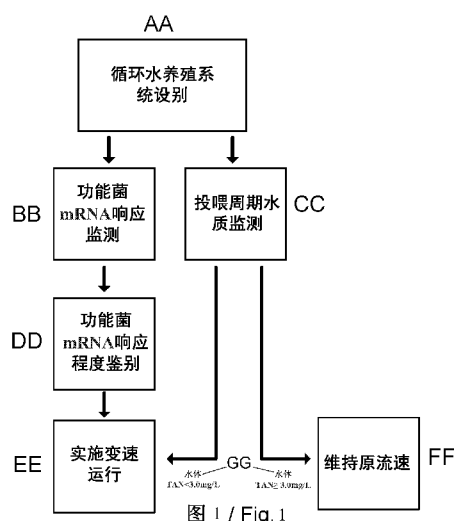


图 1 / Fig. 1

AA Identification of a recirculating aquaculture system
BB Functional bacteria mRNA response monitoring
CC Water quality monitoring in a feeding period
DD Functional bacteria mRNA response degree monitoring
EE Implement the speed change operation
FF Maintain an original flow speed
GG Water body

(57) Abstract: Disclosed are an mRNA response-based variable flow control method and system of a recirculating aquaculture system, so as to achieve coordinated regulation of a biofilter of a recirculating aquaculture system and a microorganism response. The mRNA real-time expression quantity of functional microbial ammonia oxidizing bacteria (AOB) is obtained, so that the flow speed of the system is increased in an mRNA response high expression time period of the AOB, and the flow speed of the system is reduced in a response low expression time period. The problems are solved that an existing aquaculture water treatment biofilter is low in treatment efficiency and high in running energy consumption from the perspectives of coordinated regulation of the industrial aquaculture water treatment technology and a microorganism response.

(57) 摘要: 公开了一种基于 mRNA 响应的循环水养殖系统变速流控制方法及系统, 实现协同调控循环水养殖系统的生物滤器与微生物响应。通过获取功能微生物氨氧化菌 AOB 的 mRNA 实时表达量, 在 AOB 的 mRNA 响应高表达时间段, 提高系统流速, 在响应低表达时间段, 降低系统流速。从工厂化养殖水处理工艺与微生物响应协同调控的角度出发, 解决了现有养殖水处理生物滤器处理效率低、运行能耗偏大等问题。

WO 2016/019572 A1

说明书

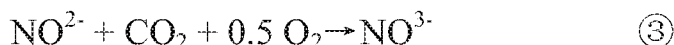
基于 mRNA 响应的循环水养殖系统变速流控制方法及系统

技术领域

本发明涉及水产养殖水处理技术，尤其涉及一种工厂化循环水养殖系统生物滤器高效精准节能的变速流控制方法。

背景技术

工厂化循环水养殖系统因具有资源节约、环境友好的特点，已成为世界范围内大力推崇发展的水产养殖模式。在超高密度集约化养殖条件下，其系统的核心处理技术为生物过滤，方式主要为通过配置生物滤器，利用定向富集在滤料表面的微生物完成水体主要污染物总氨氮 TAN(Total Ammonia Nitrogen)与亚硝酸盐(NO_2^- -N)的去除。其过程主要通过功能微生物群的硝化作用，将总氨氮 TAN 等通过氨氧化细菌 AOB(Ammonia Oxidizing Bacteria)具有的氨单加氧酶催化氧化为羟胺，再由羟胺氧化为中间产物亚硝酸盐，最后由亚硝酸盐氧化菌 NOB(Nitrite Oxidizing Bacteria)将亚硝酸氧化成对养殖对象相对无害的硝酸盐(NO_3^- -N)，全反应限速步奏为式①，相关化学简式如下：



在实际生产实践中，系统养殖规模（饵料投喂量）与生物滤器的有效容积均已固定，其生物滤器总处理性能主要与流速有关。为维持高密度养殖负荷下较适宜的水质条件，系统运行过程需要较高的流速，通常循环水养殖系统的水力停留时间 HRT(Hydraulic Retention Time)为 0.5-1h，即生物滤器日均循环 24-48 次。

然而上述生物滤器恒速运行方法仍然面临如下弊端：在稳定运行的循环水养殖系统内，生物滤器内污染物总氨氮 TAN 主要源于养殖对象排氨，而相关的排氨速率则主要与饲料量及投喂节律有关，系统水质日变化呈现相对“峰-谷”浓度，因此维持系统较高恒速流动，虽可确保水质稳定，但在污染物浓度峰值时间段内，生物滤器基质来源因流速恒定受限，在谷值时间段，则因低基

质浓度使其处于低效运行，故生物滤器单次循环处理效率偏低。为达到总污染物处理量，系统需维持较高流速，从而造成整体能耗偏高。

由于循环水养殖系统水体始终处于内部循环，故其某时间节点的污染物浓度值为养殖对象排氨、生物滤器处理后的最终结果，若以此为依据实现变速流控制，其信息来源滞后，仅从表观层面被动改变系统流速，无法有效提高系统生物滤器单次处理效能，其需依靠牺牲系统水质实现节能。

发明内容

本发明的目的是克服现有技术的不足，提供一种基于 mRNA 响应的循环水养殖系统变速流控制方法及系统，从而实现循环水养殖系统运行节能降耗。

本发明通过检测单投喂周期内循环水养殖系统生物滤器内滤料表面功能微生物 AOB 编码氨单加氧酶的 *amoA* 基因的 mRNA 响应表达量，在其高表达时间段提高系统流速，以供应更多基质用于其 mRNA 转录，在低表达时间段，降低流速实现节能。由于 *amoA* 基因的 mRNA 编码产物为氨单加氧酶（功能蛋白质），其作用为硝化过程催化总氨氮氧化为羟胺的限速步奏关键酶，且蛋白质的半衰期长于 mRNA 半衰期，故通过提升 mRNA 高表达段的流速，可促使功能微生物 AOB 实现氨单加氧酶的有效积累，从而可为降低流速时间段生物滤器仍具有较高处理性能奠定物质基础。本发明依据上述原理，进行生物滤器精准调控与变速流运行，通过提升其单次处理效能，实现循环水养殖系统总流量削减与节能。

一种基于 mRNA 响应的循环水养殖系统变速流控制方法，协同调控循环水养殖系统的生物滤器与微生物响应，获取功能微生物 AOB 的 mRNA 实时表达量，在 AOB 的 mRNA 响应高表达时间段，提高系统流速，在响应低表达时间段，降低系统流速。

其实施的基本流程为：

- 1)、对投喂周期内的系统水质进行监测；
- 2)、对投喂周期内生物滤器的滤料表面功能微生物 AOB 的 mRNA 响应表达水平进行监测；
- 3)、分析得到投喂周期内功能微生物 AOB 的 mRNA 高表达与低表达时间段；
- 4)、综合水质数据，对功能微生物 AOB 的 mRNA 高表达峰值前后 1h 时间段提高系统流速 10-30%，对 mRNA 低表达时间段降低流速 20-50%。

所述的循环水养殖系统，主要采用固液分离-生物净化两级处理手段去除系统污染物，且运行稳定。

所述的循环水养殖系统,其单投喂周期内饵料投加量 A (kg)与生物滤器有效容积 B (m³)间的比值, $A/B \leq 6.67$ 。

所述的 AOB 的 mRNA 响应高表达与低表达判断依据,高表达值 C 与低表达值 D 间的比值 $C/D \geq 5$,或具有统计学差异 ($P < 0.1$),所述的表达值单位为碱基拷贝数/ μg RNA。

所述的系统内水体总氨氮 TAN(Total Ammonia Nitrogen)浓度 $\geq 3.0\text{mg/L}$ 时,无论生物滤器功能微生物 AOB 的 mRNA 响应表达情况,系统运行均不减速。

一种采用所述方法的循环水养殖系统,采用变速流控制的装置。

本发明的有益效果是,通过改变传统循环水养殖系统生物滤器的恒定流速策略,基于单喂食周期内功能微生物 AOB 的 mRNA 表达响应水平为参考,以分别提升 mRNA 高表达段流速及降低 mRNA 低表达段流速为控制措施,实现生物滤器单次循环处理效率提升。本发明克服了传统循环水养殖系统运行过程生物滤器运行策略粗放、整体能耗偏高等弊端,具有节能增效、可实现工程化运用等诸多优点。

附图说明

图 1 是基于 mRNA 响应的循环水养殖系统变速流控制方法实施流程图。

具体实施方式

如附图 1 所示,本发明可以通过以下技术方案来实现的:

- 1、本发明的实施对象为循环水养殖系统,其主要为系统污染物去除依靠固液分离-生物净化两级处理手段,且运行稳定。系统内养殖生物量波动小,投喂周期与节律固定。
- 2、循环水系统单投喂周期水质状况监测,方法为至投喂时间点伊始,每间隔 1h 测定水质中 TAN 含量,取样点一般建议需至少包括 3 处(养殖池 2 处、生物滤器 1 处),测定持续时间 24h,测定方法可采用蔡氏试剂法等国标标准方法,要求测定精度为 0.1mg/L 。
- 3、生物滤器内功能微生物 AOB 的 mRNA 响应表达监测,其实施方法为:

一、样品前处理

(1) 至投喂时间点伊始,每间隔 1h 取生物滤器内环装滤料 3 个或微珠滤料 30ml,并立即加入商用 RNA 保护液 5ml。(2) 将样品放置在磁力振荡器上震荡 10min 后,在离心机上高速离心 5min 后(运行条件 4°C , 12000 转),弃去上清液后,将生物膜泥样重悬浮至 2ml 商用 RNA 保护液,并存储在 -80°C 待用。

二、样品 RNA 提取与反转录 cDNA

(1) 采用商用 RNA 试剂盒进行样品 RNA 提取, 流程依照试剂盒说明书操作。(2) 将提取的总 RNA 采用商用试剂盒反转录为 cDNA, 反应条件为 42℃, 1h; 70℃, 15min; 8℃, +∞。

三、功能微生物氨氧化细菌 AOB 的 mRNA 的绝对定量(Rt-qPCR)

(1) 以功能微生物氨氧化细菌 AOB 的氨单加氧酶编码段 amoA 基因为目标区, 选用引物为 amoA-1F /amoA-2R (GGGGTTTCTACTGGTGGT/CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC)进行扩增, PCR 反应条件为: (i) 95℃, 5min; (ii) 95℃, 20s; (iii) 55℃, 30s; (iv) 72℃, 30s; (v) 重复(ii)~(iv)步奏 40 个循环; (vi) 72℃, 7min; (vii) 8℃, +∞。(2) 标准曲线制备方法为: (i)在 10μl DNA 溶液中加入 100μl 感受态细胞中, 冰上放置 30min。然后 42℃加热 45s 后, 再在冰中放置 1min; (ii)加入 890μl SOC 培养基, 37℃振荡培养 60min; (iii)取 100μl 细菌培养液均匀涂布在含有氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基平板上, 37℃倒置过夜培养; (iv)挑选白色菌落, 使用 PCR 法确认载体中插入片段的长度大小。(v)采用商用质粒提取试剂盒提取克隆质粒, 并用微量紫外外分光光度计测定质粒浓度, 以梯度稀释的克隆质粒制备标注曲线。(3) 以标准曲线计算各样品氨氧化功能菌 AOB 的 mRNA 绝对丰度, 单位为 (碱基拷贝数/μg RNA)。

4、单喂食周期内样品功能菌 AOB 的 mRNA 表达程度鉴定

(1) 将各时间节点监测的功能菌 AOB 的 mRNA 绝对表达量以时间序列绘制曲线图, 寻找曲线上的“高表达值”与“低表达值”。(2) 将高表达值 C (碱基拷贝数/μg RNA)与低表达值 D (碱基拷贝数/μg RNA)间的比值进行计算, 若 $C/D \geq 5$, 或具有统计学差异($P < 0.1$), 则认为该时间点即为高表达值与低表达值。连续 2 个以上高表达值或低表达值即可认为是高表达时间段或低表达时间段。

5、基于 mRNA 响应的生物滤器流速调节

(1) 综合水质数据, 对功能微生物 AOB 的 mRNA 高表达峰值前后 1h 时间段提高系统流速约 10-30%, 对 mRNA 低表达时间段降低流速约 20-50%。(2) 当系统内水体总氨氮 TAN 浓度 $\geq 3.0\text{mg/L}$ 时, 无论生物滤器功能微生物 mRNA 响应表达情况, 系统运行均不减速。

实施例

依据本发明方法, 对养殖对象为尼罗罗非鱼(*Oreochromis Niloticus*) 的循环水养殖系统进行了效果检验。其中恒速运行时间 33 天, 变速运行时间 36 天, 变速控制以某变频器 (VFD-015M) 实现, 效果如表 1 所示。

表 1 实际循环水养殖系统变速流实施效果

	使用前	使用后
养殖负荷	35kg/m ³	35kg/m ³
日投喂量	8.4kg/d	8.4kg/d
系统平均流速	24m ³ /h	18.24±0.5m ³ /h
日流量	576m ³ /d	437.76m ³ /d
日能耗	26.4 kw/d	20.1kw/d
日能耗节约量	0%	23.86%
TAN 浓度	1.04±0.45mg/L	1.16±0.33mg/L
亚硝酸盐 (NO ₂ ⁻ -N) 浓度	0.05±0.01 mg/L	0.04±0.01 mg/L

。

最后需要说明的是：以上实施例仅用以说明本发明的技术方案，而非对其限制；尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对前述各实施例所描述的技术方案进行修改或对其部分技术进行同等替换；而这些修改或替换，并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施技术方案的精神和范围。

权 利 要 求 书

- 1、一种基于 mRNA 响应的循环水养殖系统变速流控制方法，其特征在于，协同调控循环水养殖系统的生物滤器与微生物响应，获取功能微生物 AOB 的 mRNA 实时表达量，在 AOB 的 mRNA 响应高表达时间段，提高系统流速，在响应低表达时间段，降低系统流速。
- 2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，实施的基本流程为：
 - 1)、对投喂周期内的系统水质进行监测；
 - 2)、对投喂周期内生物滤器内滤料表面功能微生物 AOB 的 mRNA 响应表达水平进行监测；
 - 3)、分析得到投喂周期内功能微生物 AOB 的 mRNA 高表达与低表达时间段；
 - 4)、综合水质数据，对功能微生物 AOB 的 mRNA 高表达峰值前后 1h 时间段提高系统流速 10-30%，对 mRNA 低表达时间段降低流速 20-50%。
- 3、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的循环水养殖系统，主要采用固液分离-生物净化两级处理手段去除系统污染物，且运行稳定。
- 4、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述的循环水养殖系统，其单投喂周期内饵料投加量 A (kg)与生物滤器有效容积 B (m³)间的比值, $A/B \leq 6.67$ 。
- 5、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的 AOB 的 mRNA 响应高表达与低表达判断依据，高表达值 C 与低表达值 D 间的比值 $C/D \geq 5$ ，或具有统计学差异 ($P < 0.1$)，所述的表达值单位为碱基拷贝数/ $\mu\text{g RNA}$ 。
- 6、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的系统内水体总氨氮 TAN(Total Ammonia Nitrogen)浓度 $\geq 3.0\text{mg/L}$ 时，无论生物滤器功能微生物 AOB 的 mRNA 响应表达情况，系统运行均不减速。
- 7、一种采用如权利要求 1 所述方法的循环水养殖系统，其特征在于，采用变速流控制的装置。

说明书附图

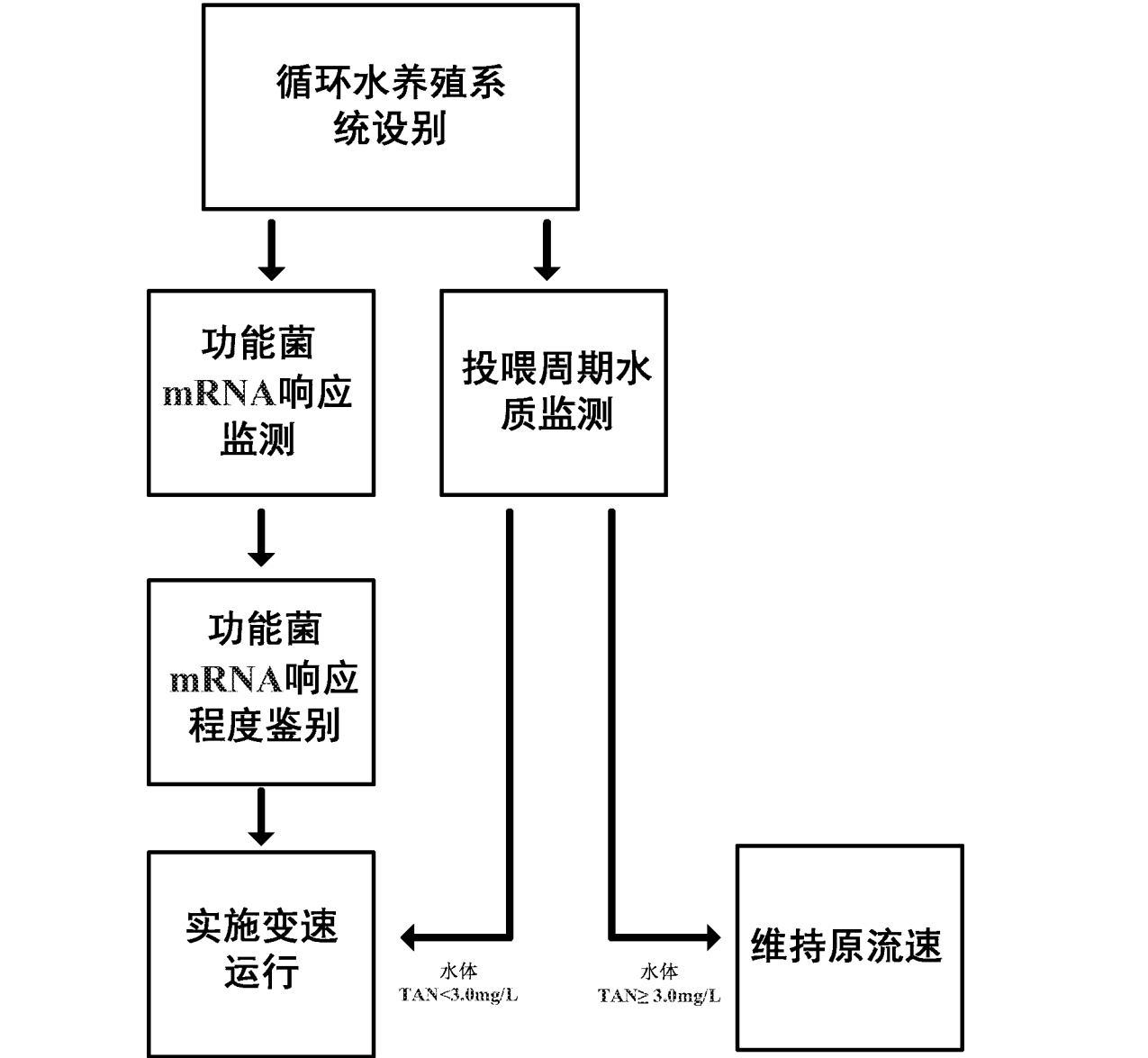


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/083985

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K 63/04 (2006.01) i; C12Q 1/68 (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)

A01K; 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)

WPI, EPODOC, CNABS, CNKI, ISI: zhejiang university, RUAN Yunjie, ZHU Songming, recycl+, Ammonia oxidizing Bacteria, AOB, biofilter, culture, cultivation, closed circuit, mRNA, PCR, nitrification, amplification, molecular biology, biological monitoring

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 101664010 A (DALIAN HUIXIN TITANIUM EQUIPMENT DEV. CO., LTD) 10 March 2010 (10.03.2010) description, paragraphs [0006]-[0011], and figures 1 and 2	1-7
Y	LI, Lei et al. "Application of Molecular Biological Techniques for Analyzing Nitrifier Communities in Wastewater Treatmentvol". Applied & Environmental Biology, 16, no. 01, 25 February 2010 (25.02.2010), pages 135-142	1-7
Y	CN 1531601 A (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 22 September 2004 (22.09.2004) claim 4, and embodiment 2	1-7
A	CN 1987428 A (CHENGDU BIOLOGICAL INST., CAS) 27 June 2007 (27.06.2007) claims 1-5	1-7
A	CN 202218569 A (NINGBO UNIVERSITY) 16 May 2012 (16.05.2012) claims 1-10, and figure 1	1-7
E	CN 104145874 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 19 November 2014 (19.11.2014) claims 1-7	1-7

☐ 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 10 March 2015	Date of mailing of the international search report 01 April 2015
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 WEI, Lixian Telephone No. (86-10) 62414246

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/083985

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101664010 A	10 March 2010	None	
CN 1531601 A	22 September 2004	CN 1268767 C	09 August 2006
		US 2003092020 A1	15 May 2003
		MX 2003009732 A1	01 February 2004
		EP 1414750 A2	06 May 2004
		WO 02085791 A3	04 March 2004
		AU 2002257205 A1	05 November 2002
		WO 02085791 A2	31 October 2002
		BR 0209095 A	13 July 2004
		US 6849430 B2	01 February 2005
		IN 200301665 P4	14 August 2009
		AU 2002257205 B2	21 September 2006
		AR 035832 A1	14 July 2004
		CA 2444316 A1	31 October 2002
CN 1987428 A	27 June 2007	None	
CN 202218569 A	16 May 2012	None	
CN 104145874 A	19 November 2014	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/083985

A. 主题的分类

A01K 63/04(2006.01)i; C12Q 1/68(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)

A01K; 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))

WPI, EPODOC, CNABS, CNKI, ISI: 浙江大学, 阮贇杰、朱松明, 养殖, 循环, 闭路, mRNA, PCR, 氨氧化, 硝化, 扩增, 分子生物, 生物监测, 生物滤池, recycl+, Ammonia oxidizing Bacteria, AOB, biofilter, culture, cultivation

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	CN 101664010 A (大连汇新钛设备开发有限公司) 2010年 3月 10日 (2010 - 03 - 10) 说明书第6-11段, 附图1-2	1-7
Y	李磊等. "分子生物技术在污水处理系统内硝化菌群研究中的应用" 应用与环境生物学报, 第16卷卷, 第1期期, 2010年 2月 25日 (2010 - 02 - 25), 第135-142页	1-7
Y	CN 1531601 A (孟山都技术有限公司) 2004年 9月 22日 (2004 - 09 - 22) 权利要求4, 实施例2	1-7
A	CN 1987428 A (中国科学院成都生物研究所) 2007年 6月 27日 (2007 - 06 - 27) 权利要求1-5	1-7
A	CN 202218569 A (宁波大学) 2012年 5月 16日 (2012 - 05 - 16) 权利要求1-10, 附图1	1-7
E	CN 104145874 A (浙江大学) 2014年 11月 19日 (2014 - 11 - 19) 权利要求1-7	1-7

☐ 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

2015年 3月 10日

国际检索报告邮寄日期

2015年 4月 1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)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

授权官员

卫立现

电话号码 (86-10)010-62414246

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/083985

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	101664010	A	2010年 3月 10日	无			
CN	1531601	A	2004年 9月 22日	CN	1268767	C	2006年 8月 9日
				US	2003092020	A1	2003年 5月 15日
				MX	2003009732	A1	2004年 2月 1日
				EP	1414750	A2	2004年 5月 6日
				WO	02085791	A3	2004年 3月 4日
				AU	2002257205	A1	2002年 11月 5日
				WO	02085791	A2	2002年 10月 31日
				BR	0209095	A	2004年 7月 13日
				US	6849430	B2	2005年 2月 1日
				IN	200301665	P4	2009年 8月 14日
				AU	2002257205	B2	2006年 9月 21日
				AR	035832	A1	2004年 7月 14日
				CA	2444316	A1	2002年 10月 31日
CN	1987428	A	2007年 6月 27日	无			
CN	202218569	A	2012年 5月 16日	无			
CN	104145874	A	2014年 11月 19日	无			

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)