



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104602519 B

(45)授权公告日 2018.08.14

(21)申请号 201380045898.8

(22)申请日 2013.09.16

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104602519 A

(43)申请公布日 2015.05.06

(30)优先权数据

61/702,446 2012.09.18 US

61/803,155 2013.03.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.03.03

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/059885 2013.09.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/046990 EN 2014.03.27

(73)专利权人 陶氏环球技术有限公司

地址 美国密执安州

专利权人 罗门哈斯公司

(72)发明人 U·甘地 C·麦金尼斯

P·O·斯库克 C·M·舒尔茨

T·M·威廉姆斯

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 胡嘉倩 江磊

(51)Int.Cl.

A01N 25/30(2006.01)

A01N 43/80(2006.01)

A01P 1/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 102626091 A,2012.08.08,说明书第11-12页表1.

CN 102438446 A,2012.05.02,说明书第2-3页实施例1,第19页实施例30.

US 4295932,1981.10.20,权利要求1-5.

WO 2012/068455 A1,2012.05.24,权利要求1-22.

EP 1767091 A1,2007.03.28,参见权利要求1-11.

CN 101868150 A,2010.10.20,说明书第1-7页.

CN 101316921 A,2008.12.03,说明书第1-10页.

WO 2009/011014 A1,2009.01.22,说明书第1-20页.

CN 101679913 A,2010.03.24,说明书第1-32页.

审查员 白小琳

权利要求书1页 说明书28页

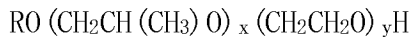
(54)发明名称

杀微生物组合物

(57)摘要

提供了一种具有两组分的水性杀微生物组合物。第一种组分是0.5-5重量%的5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮的混合物。第二种组分是1-10重量%包含C₆-C₁₂烷基基团,平均3-7摩尔环氧丙烷聚合单元和平均5-12摩尔环氧乙烷的聚合单元的非离子表面活性剂。

1. 一种水性杀微生物组合物,其包含:(a) 0.5-5重量%的5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮的混合物;和(b) 1-10重量%的包含C₆-C₁₂烷基基团,平均3-7摩尔环氧丙烷的聚合单元和平均5-12摩尔环氧乙烷的聚合单元的非离子型表面活性剂,所述非离子型表面活性剂具有以下结构:



其中R是C₆-C₁₂支链烷基,x是3-7,y是5-12。

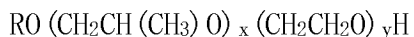
2. 如权利要求1所述的组合物,所述组合物具有3-8重量%的所述非离子型表面活性剂。

3. 如权利要求2所述的组合物,其特征在于,R是C₇-C₉支链烷基,x是4-6,y是5-7或8-10。

4. 如权利要求3所述的组合物,所述组合物具有1-3重量%的所述混合物。

5. 如权利要求4所述的组合物,其特征在于,R是2-乙基己基,y是6或9,5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮的重量比为2.5:1至3.5:1,所述非离子型表面活性剂与所述混合物的重量比为5:1至2:1。

6. 一种协同杀微生物组合物,其包含:(a) 5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮的混合物;和(b) 具有以下结构的非离子型表面活性剂:



其中R是C₈支链烷基,x是5,y是6或9。

7. 如权利要求6所述的协同杀微生物组合物,其特征在于,5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮与2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮的重量比为2.5:1至3.5:1。

8. 如权利要求7所述的协同杀微生物组合物,其特征在于,R是2-乙基己基,y是9;所述混合物与所述非离子型表面活性剂的重量比为1:2至1:50。

9. 如权利要求7所述的协同杀微生物组合物,其特征在于,R是2-乙基己基,y是6;所述混合物与所述非离子型表面活性剂的重量比为1:0.5至1:10。

10. 一种水性杀微生物组合物,其包含:(a) 5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮的混合物;和(b) 包含C₆-C₁₂支链烷基,平均3-7摩尔环氧丙烷的聚合单元和平均5-12摩尔环氧乙烷的聚合单元的非离子型表面活性剂,其中,所述非离子表面活性剂与所述混合物的重量比为10:1-0.8:1。

杀微生物组合物

[0001] 本发明涉及包含5-氯-2-甲基异噻唑啉-3-酮、2-甲基异噻唑啉-3-酮和表面活性剂的杀微生物组合物。

[0002] 美国专利4,295,932中描述了含5-氯-2-甲基异噻唑啉-3-酮、2-甲基异噻唑啉-3-酮和非离子型分散剂的组合物。该组合物包含3:1的5-氯-2-甲基异噻唑啉-3-酮和2-甲基异噻唑啉-3-酮的混合物,以及似乎与PLURONIC L61或TERGITOL L61分散剂具有相同组成的环氧乙烷和环氧丙烷的共聚物。然而,仍然需要包含5-氯-2-甲基异噻唑啉-3-酮和2-甲基异噻唑啉-3-酮的替代组合物。

[0003] 本发明所解决的问题是提供一种包含5-氯-2-甲基异噻唑啉-3-酮和2-甲基异噻唑啉-3-酮的替代组合物。

发明内容

[0004] 本发明涉及一种水性杀微生物组合物,该组合物包含:(a) 0.5-5重量%的5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮的混合物;和(b) 1-10重量%的包含C₆-C₁₂烷基基团,平均3-7摩尔环氧丙烷的聚合单元和平均5-12摩尔环氧乙烷的聚合单元的非离子型表面活性剂。

[0005] 本发明还涉及一种协同杀微生物组合物,该组合物包含:(a) 5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮的混合物;和(b) 具有以下结构的非离子型表面活性剂:

[0006] $\text{RO}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_x(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_y\text{H}$

[0007] 其中R是C₈烷基基团,x是5,y是6或9。

[0008] 本发明还涉及一种水性杀微生物组合物,该组合物包含:(a) 5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮的混合物;和(b) 包含C₆-C₁₂烷基基团,平均3-7摩尔环氧丙烷的聚合单元和平均5-12摩尔环氧乙烷的聚合单元的非离子型表面活性剂,其中,所述非离子型表面活性剂与所述混合物的重量比为10:1-0.8:1。

具体实施方式

[0009] “MIT”是2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮,也被称为2-甲基-3-异噻唑啉酮(isothiazolone)。“CMIT”是5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮,也被称为5-氯-2-甲基-3-异噻唑啉酮(5-chloro-2-methyl-3-isothiazolone)。较佳的是,CMIT与MIT的重量比至少为2:1,或者至少为2.5:1。较佳的是,CMIT与MIT的重量比不超过4:1,优选不超过3.5:1。在本发明的一个优选的实施方式中,CMIT:MIT之比约为3:1。

[0010] 在本文中,除非上下文明确有不同的说明,以下术语具有所限定的含义。术语“杀微生物剂”表示能够在某一区域抑制微生物生长或控制微生物生长的化合物;杀微生物剂包括杀菌剂、杀真菌剂和杀藻剂。术语“微生物”包括例如真菌(例如酵母菌和霉菌)、细菌和藻类。在本文中,术语“固体”组合物表示在25℃下为固体的组合物。在本说明书中使用以下缩写:ppm=百万分之一重量份(重量/重量),mL=毫升。除非另有说明,温度是摄氏度(℃),

百分比是重量百分比(重量%),用量和比率是基于活性成分,即异噻唑啉酮和非离子型表面活性剂。固体组合物中水的百分含量包括以任意水合盐形式和任意可能存在的游离水的形式存在的水。

[0011] 优选地,水性组合物包含至少0.8重量%CMIT和MIT的混合物(以活性成分计),优选至少1重量%,优选至少1.1重量%的所述混合物,优选至少1.2重量%,优选至少1.3重量%;优选组合物包含不超过4.5重量%的所述混合物,优选不超过4重量%,优选不超过3.5重量%,优选不超过3重量%,优选不超过2.5重量%,优选不超过2重量%,优选不超过1.8重量%。优选地,基于CMIT/MIT和表面活性剂的活性成分的重量,非离子表面活性剂与CMIT/MIT混合物的重量比不超过10:1,优选不超过8:1,优选不超过6:1,优选不超过5:1,优选不超过4:1,优选不超过3.5:1,优选不超过3:1;优选至少0.8:1,优选至少1:1,优选至少1.5:1,优选至少2:1,优选至少2.5:1,优选至少3:1。

[0012] “金属硝酸盐”优选是碱金属、碱土金属或铵的硝酸盐。较佳的是,所述金属是锂、钠、钾、镁、钙、铵或其组合;更优选是钠、钾、镁或其组合。特别优选的是镁。

[0013] 水性组合物优选包含至少70重量%的水,优选至少80重量%,优选至少85重量%,优选至少87重量%,优选至少89重量%。优选地,水性组合物包含至少0.5重量%的金属硝酸盐,优选至少1.2重量%,优选至少1.4重量%,优选至少2wt%;优选不超过8重量%,优选不超过6重量%,优选不超过5重量%,优选不超过4重量%,优选不超过3重量%。优选地,水性组合物包含至少0.005重量%碘酸、溴酸、高碘酸及其盐中的至少一种;优选至少0.01重量%,优选至少0.015重量%,优选至少0.02重量%;优选不超过0.2重量%,优选不超过0.1重量%,优选不超过0.05重量%。优选地,可使用铜基稳定剂,包括硝酸铜、硫酸铜、或者其他盐,优选包含至少0.05重量%,优选至少0.10%,优选至少0.15%,优选至少0.20%;优选不超过2.0%,优选不超过1.0%,优选不超过5.0%。此外,可使用过氧化物和溴硝丙二醇(bronopol)基稳定剂。通常,水性组合物可以稀释至1.0-15ppm CMIT/MIT(基于活性成分)用于工业应用。

[0014] 优选地,非离子型表面活性剂具有以下结构:

[0015] $\text{RO}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_x(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_y\text{H}$

[0016] 其中R是C₆-C₁₂烷基基团,x是3-7,y是5-12。x和y是源自化合物混合物的平均值。优选地,R是C₆-C₁₀烷基基团,优选C₇-C₉烷基基团,优选C₈烷基基团,优选2-乙基己基基团。优选地,R是支链烷基。优选地,x是4-6,优选约为5。优选地,y是5-10,优选6-10,优选6-9,优选5-7或8-10,优选7-10,优选8-10,优选约为9。优选地,水性组合物包含至少2重量%的所述非离子型表面活性剂(基于活性成分),优选至少3重量%,优选至少3.5重量%,优选至少4重量%;优选不超过9重量%,优选不超过8wt%,优选不超过7wt%,优选不超过6.5wt%,优选不超过6wt%。

[0017] 水性组合物中可以包含痕量的有机溶剂,所述痕量有机溶剂是制备异噻唑啉酮杀微生物剂的过程中引入的。优选地,水性组合物中有机溶剂的总量不超过1%,优选不超过0.5%,优选不超过0.3%,优选不超过0.2%,优选不超过0.1%。可以存在的常规的有机溶剂包括例如乙醇、乙酸乙酯、乙酸、乙酸丁酯、丁醇和二氯甲烷。

[0018] 优选地,水性组合物基本上不含其他表面活性剂,即包含小于1重量%除所述非离子型表面活性剂之外的表面活性剂,优选小于0.5重量%,优选小于0.3重量%,优选小于

0.2重量%，优选小于0.1重量%，优选小于0.05重量%。

[0019] 优选地，协同杀微生物组合物包含：(a) 5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮的混合物；和(b) 包含C₈烷基基团，平均5摩尔环氧丙烷的聚合单元和平均9摩尔环氧乙烷的聚合单元的非离子型表面活性剂。优选地，所述混合物与所述非离子型表面活性剂的重量比为1:2至1:50。优选地，协同杀微生物组合物包含：(a) 5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮的混合物；和(b) 包含C₈烷基基团，平均5摩尔环氧丙烷的聚合单元和平均6摩尔环氧乙烷的聚合单元的非离子型表面活性剂。优选地，所述混合物与所述非离子型表面活性剂的重量比为1:0.5至01:10。优选地，非离子型表面活性剂具有以下结构：

[0020] $\text{RO}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_x(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_y\text{H}$

[0021] 其中R是C₈烷基基团，x是5，y是6或9，优选9。优选地，C₈烷基是2-乙基己基。CMIT/MIT混合物(3:1重量比)与上式的非离子型表面活性剂对绿脓假单胞菌(*P.aeruginosa*)、阴沟肠杆菌(*E.cloacae*)和肺炎杆菌(*K.pneumoniae*)具有协同作用，式中R是2-乙基己基，x是5，y是9；该组合对于抑制阴沟肠杆菌的生长尤其有效。CMIT/MIT混合物(3:1重量比)与上式的非离子型表面活性剂(式中R是2-乙基己基，x是5，y是6)对阴沟肠杆菌(*E.cloacae*)和肺炎杆菌(*K.pneumoniae*)具有协同作用。优选地，协同杀微生物组合物基本上不含其他异噻唑啉酮，即基于活性成分的总重量，含有小于1重量%除CMIT/MIT之外的异噻唑啉酮，优选小于0.5重量%，优选小于0.2重量%，优选小于0.1重量%。优选地，协同杀微生物组合物基本上不含其他杀微生物剂，即基于活性成分的总重量，含有小于1重量%除CMIT/MIT之外的杀微生物剂，优选小于0.5重量%，优选小于0.2重量%，优选小于0.1重量%。

[0022] 本发明的组合物可包含其他成分，例如消泡剂和乳化剂。可通过在受微生物侵袭的区域之上、之内或之处引入抗微生物有效量的本发明的杀微生物组合物来抑制微生物或者更高级的水生生物(例如原生动物，无脊椎动物，苔藓动物，腰鞭毛类，甲壳类动物，软体动物等)的生长。合适的区域包括例如：工业工艺用水；电涂覆沉积系统；冷却塔；空气洗涤器；气体洗涤器；矿物浆液；废水处理系统；装饰用喷泉；反渗透过滤器；超滤装置；压舱水；蒸发冷凝器；热交换器；纸浆和纸加工液及添加剂；淀粉；塑料；乳液；分散体；油漆；胶乳；涂料，例如清漆；建筑产品，例如胶泥、填漏材料和密封剂；结构粘合剂，例如陶瓷粘合剂、地毯背衬粘合剂和层叠粘合剂；工业用或消费用粘合剂；摄影用化学品；印刷液；家用产品，例如卫生间和厨房清洁剂；化妆品；化妆用品；香波；肥皂；洗涤剂；工业清洁剂；地板蜡；洗衣房漂洗水；金属加工液；输送带润滑剂；液压机液体；皮革和皮革制品；织物；织物产品；木材和木材产品，例如胶合板、碎纸胶合板、刨花板、叠层梁、取向的绞合板、硬纸板和碎料板；石油加工液；燃料；油田液，例如注入水、断裂液和钻探泥浆；农业辅助保存；表面活性剂保存；医疗器件；诊断试剂保存；食物保存，例如塑料或纸质食物包装；食物、饮料、以及工业处理巴氏灭菌器；抽水马桶；娱乐用水；池塘；和温泉。

[0023] 本申请中抑制或控制微生物的生长所需的本发明杀微生物组合物的具体用量可以变化。通常，如果提供0.1-1,000ppm(百万分之一)组合物的活性成分，本发明组合物的用量足以控制微生物的生长。较佳的是在该区域中组合物的活性成分(即非离子型表面活性剂和异噻唑啉酮的混合物)的用量至少为1ppm，优选至少为5ppm，优选至少为10ppm，优选至少为20ppm。优选地，该区域中组合物活性成分的用量不超过700ppm，优选不超过400ppm，优

选不超过200ppm,优选不超过100ppm,优选不超过50ppm,优选不超过30ppm,优选不超过20ppm。

[0024] 在工业和商业冷却水体系中,优选活性成分的总浓度至少为1ppm,优选至少2ppm,优选至少3ppm;优选不超过25ppm,优选不超过20ppm,优选不超过15ppm,优选不超过12ppm,优选不超过10ppm,优选不超过8ppm,优选不超过6ppm。在本发明方法中,通过同时或者分别加入非离子型表面活性剂和异噻唑啉酮混合物来处理工业和商业冷却水体系,用量为能产生上文所述的浓度。

[0025] 实施例

[0026] 实施例1.Pluronic表面活性剂与CMIT/MIT杀生物剂的相容性筛选。

[0027] 过去已知各种表面活性剂(包括一些Pluronic表面活性剂)可改善低水平的CMIT/MIT(3:1重量比)杀生物剂的功效以控制表面上细菌生物淤积。在本发明的所有测试中,CMIT/MIT不含铜或碘酸盐稳定剂。对于各种生物体,在各个时间点并且在各种基质中,杀生物剂与表面活性剂组合在1.5:5重量比时能有效控制生物淤积。PLURONIC和TERGITOL L表面活性剂是环氧丙烷(PO)和环氧乙烷(EO)的共聚物,通过用环氧乙烷对聚丙二醇封端进行制备。在计数系统中第一个数字乘以300得到聚合的PO核的分子量,第二个数字乘以10得到表面活性剂中聚合的环氧乙烷的百分比。例如,PLURONIC L61具有分子量1800的PO核和总共10%的EO。

[0028] 然而,采用两部分(两个鼓)处理用于微生物控制是不理想的,因为这需要额外的泵、定时器、管道、电、存量、空间和维护。最理想的给料系统是单一产品(一个鼓)方案。然而,制剂的组合必需显示优异的相容性和稳定性以成为可行的选项。

[0029] 包含杀生物剂和表面活性剂的组合的稳定制剂必需显示优良的物理和化学相容性的最低标准,尤其是在升高温度的储存情况下。最少至没有来自产品的泡沫也是组合产品的重要特征。

[0030] 在该筛选研究中,对以1%和5%与CMIT/MIT杀生物剂组合的一些Pluronic表面活性剂(巴斯夫公司(BASF Co.))进行评价。在40°C对含表面活性剂的杀生物剂的物理稳定性评价一周。在该实施例中,杀生物剂配制成1.5%的最终浓度并且用0.15%硝酸铜稳定。

[0031] 研究结果表明,Pluronic L62(在1或5%)与CMIT/MIT的制剂导致相分离,因而不适合应用。含Pluronic L43的MIT/MIT制剂在1:1比率时也发生相分离,但1:5重量比没有。然而,Pluronic L44与CMIT/MIT组合没有相分离。基于这些筛选结果,CMIT/MIT与Pluronic L44表面活性剂的制剂适合进一步相容性测试。

[0032]	杀生物剂	表面活性剂	物理稳定性 40° C 一周后观察	是否适合组合制剂
	1.5% CMIT/MIT	无	无相分离	未检测
	1.5% CMIT/MIT	1% Pluronic L62 LF	相分离	否
	1.5% CMIT/MIT	5% Pluronic L62 LF	相分离	否
	1.5% CMIT/MIT	1% Pluronic L43	相分离	否
	1.5% CMIT/MIT	5% Pluronic L43	无相分离	是
	1.5% CMIT/MIT	1% Pluronic L44	无相分离	是
	1.5% CMIT/MIT	5% Pluronic L44	无相分离	是

[0033] 实施例2.延长的热老化之后CMIT/MIT杀生物剂与Pluronic表面活性剂的相容性。

[0034] 在该稳定性/相容性研究中,对5%的Pluronic L44和L44INH表面活性剂(巴斯夫公司(BASF Co.))与1.5%的CMIT/MIT杀生物剂组合进行评价,其中杀生物剂用0.01%碘酸钾事先稳定或事后稳定。在25℃储存4周和55℃储存4-8周之后评价含表面活性剂的杀生物剂的物理/化学稳定性。合适的制剂将显示在55℃储存4周后,保留>90%的每种杀生物剂组分并且没有浑浊或沉淀。仅仅轻微的颜色改变是不希望的,但是是可以接受的,因为这不会产生固体(沉淀)或者影响给予时杀生物剂的浓度。不可接受的样品以粗体或下划线突出显示。

[0035] 研究结果表明,在升高的温度下(55℃)CMIT/MIT杀生物剂与Pluronic L44或Pluronic L44INH表面活性剂不相容。与样品2和3(事后稳定)相比,样品1和2(事先稳定)可见更严重的CMIT杀生物剂的降解。由于杀生物剂的损失(保留<95%),沉淀的形成以及浑浊外观,认为所有热老化样品均是不可接受的。因此,含Pluronic L44或L44INH表面活性剂的CMIT/MIT组合在各种热老化条件和制备方法情况下不是耐用或相容的。

[0036]

样品	重量%	周	°C	% MIT	% CMIT	% 总量	% MIT 保留	% CMIT 保留	外观
CMIT/MIT 事先稳定	10.71%	0	25	0.38	1.12	1.50	100%	100%	澄清, 无色
Pluronic L44 INH	5.00%	4	25	0.39	1.14	1.53	103%	102%	澄清, 无色
		4	55	0.33	0.01	0.34	87%	1%	浑浊, 黄色, ppt
		8	55	0.24	0.01	0.25	63%	1%	浑浊, 黄色, ppt
CMIT/MIT 事先稳定	10.71%	0	25	0.38	1.12	1.50	100%	100%	澄清, 无色
Pluronic L44	5.00%	4	25	0.39	1.13	1.52	103%	101%	澄清, 无色
		4	55	0.30	0.06	0.36	79%	5%	浑浊, 黄色, ppt
		8	55	0.24	0.05	0.29	63%	4%	浑浊, 黄色, ppt
CMIT/MIT 事后稳定	10.71%	0	25	0.36	1.06	1.4	100%	100%	澄清, 无色
Pluronic L44 INH	5.00%	4	25	0.36	1.07	1.43	100%	101%	澄清, 无色
		4	55	0.32	0.66	0.98	89%	62%	浑浊, 黄色, ppt
		8	55	0.28	0.26	0.54	78%	25%	浑浊, 黄色, ppt
CMIT/MIT 事后稳定	10.71%	0	25	0.38	1.11	1.49	100%	100%	澄清, 无色
Pluronic L44	5.00%	4	25	0.38	1.11	1.49	100%	100%	澄清, 无色
		4	55	0.35	0.88	1.23	92%	79%	浑浊, 黄色, ppt
		8	55	0.33	0.73	1.03	87%	66%	浑浊, 黄色, ppt

[0037] 实施例3.含表面活性剂的CMIT/MIT制剂的化学稳定性。

[0038] 进行额外的研究以比较在延长的热老化条件下,CMIT和MIT活性成分与不同表面

活性剂的1.5:5重量比的组合的化学稳定性。

[0039] 在该研究中,对5%的一些额外的表面活性剂与1.5%的CMIT/MIT杀生物剂的组合进行评价,其中杀生物剂用0.01%碘酸钾事先稳定或事后稳定。最初在25℃并且在55℃老化4和8周后评价含表面活性剂的杀生物剂制剂的化学稳定性。合适的制剂将显示在55℃储存4周后,保留>95%的每种杀生物剂组分并且没有浑浊或沉淀。仅仅轻微的颜色改变是不希望的,但是是可以接受的,因为这不会产生固体(沉淀)或者影响给予时杀生物剂的浓度。不可接受的样品以粗体或下划线突出显示。

[0040] CMIT/MIT与TERGITOL L-64和Surf.A (2-乙基己基,平均5个单元PO用平均9个单元EO封端)的组合显示非常好的物理和化学稳定性,55℃4-8周后均含异噻唑啉酮杀生物活性成分。只有一个样品在8周后显示显著的CMIT损失。CMIT/MIT和Surf.A的样品可见轻微颜色,但是没有观察到浑浊或沉淀。因此,这两种表面活性剂均是含CMIT/MIT杀生物剂的耐用制剂的候选。

样品	重量 %	周	°C	% MIT	% CMIT	总的 活性 成分	% MIT 保留	% CMIT 保留	外观
CMIT/MIT 事先稳定	10.71	0	25	0.39	1.16	1.55	100%	100%	澄清, 无色
Tergitol L-64	5.00	4	55	0.38	1.15	1.54	98%	99%	澄清, 无色
		8	55	0.39	1.07	1.46	99%	92%	澄清, 无色
CMIT/MIT 事后稳定	10.71	0	25	0.38	1.14	1.52	100%	100%	澄清, 无色
Tergitol L-64	5.00	4	55	0.37	1.09	1.47	98%	96%	澄清, 无色
		8	55	0.38	1.10	1.49	101%	97%	澄清, 无色
CMIT/MIT 事先稳定	10.71	0	25	0.38	1.15	1.53	100%	100%	澄清, 无色
Surf. A	5.00	4	55	0.40	1.18	1.58	105%	103%	澄清, 轻微 黄色
		8	55	0.41	1.19	1.59	107%	103%	澄清, 轻微 黄色
CMIT/MIT 事后稳定	10.71	0	25	0.38	1.12	1.50	100%	100%	澄清, 无色
Surf. A	5.00	4	55	0.37	1.11	1.48	97%	99%	澄清, 轻微 黄色
		8	55	0.39	1.11	1.50	102%	99%	澄清, 轻微 黄色

[0042] 实施例4. 含Surf.A,B,C和Tergitol表面活性剂的CMIT/MIT制剂的相容性筛选。

[0043] 进行相容性筛选研究以评价CMIT/MIT制剂与各种表面活性剂的相容性,所述表面活性剂可增强CMIT/MIT杀生物剂对于微生物生物膜控制的功效。对包含1.5%CMIT/MIT杀生物剂和5%表面活性剂的组合制剂进行物理观察。通过稀释14%CMIT/MIT产品并用0.01%碘酸钾(除非明确说不加)事后稳定,制备CMIT/MIT杀生物剂。

[0044] 结果表明,一旦用碘酸钾稳定,CMIT/MIT物理澄清,无色,没有沉淀。在40℃和55℃,从1.5%CMIT/MIT制剂中除去稳定剂导致变色和沉淀。

[0045] Surf.C (2-乙基己基,平均5个单元PO用平均3个单元EO封端)和Tergitol L-81表面活性剂(含或不含CMIT/MIT)在零时间物理上不适合(浑浊或胶凝),因此未进一步测试。

[0046] Surf. B (2-乙基己基, 平均5个单元P0用平均6个单元E0封端) 和Tergitol L-62与CMIT/MIT组合显示可变结果, 由于浑浊、颜色和高泡沫被认为不合适。

[0047] Surf. A和Tergitol L-64表面活性剂以5%与1.5%的CMIT/MIT杀生物剂配制时显示优异的物理性质和相容性。这些制剂在最高至55℃短时间热老化之后通常澄清, 没有浑浊或颜色, 最少至没有泡沫。

[0048]

表面活性剂	CMIT/MIT	时间 0	25° C 4 天	40° C 4 天	55° C 4 天
无	1.5%	澄清	澄清	澄清	澄清
	1.5% 无稳定剂	澄清	澄清	黄色, ppt	黄色, ppt
5% Surf. C	无	浑浊	-	-	-
	1.5%	浑浊	-	-	-
5% Surf. B	无	澄清	澄清, 高泡沫	浑浊, 白色	浑浊, 白色
	1.5%	澄清	澄清, 高泡沫	澄清, 轻微泡沫	浑浊, 白色, 轻微泡沫
5% Surf. A	无	澄清	澄清, 中等泡沫	澄清, 轻微泡沫	澄清, 轻微泡沫
	1.5%	澄清	澄清, 中等泡沫	澄清	澄清
5% Tergitol L-62	无	澄清	澄清, 低泡沫	澄清	浑浊
	1.5%	澄清	澄清, 低泡沫	澄清	浑浊, 轻微变黄
5% Tergitol L-64	无	澄清	澄清	澄清	澄清
	1.5%	澄清	澄清	澄清	澄清
5% Tergitol L-81	无	浑浊, 胶凝, 相分离	-	-	-
	1.5%	浑浊, 胶凝, 相分离	-	-	-

[0049] 实施例5. 延长的热老化之后含Surf. A和Tergitol L-64表面活性剂的CMIT/MIT制剂的相容性和稳定性。

[0050] 对含Surf. B, Surf. A和Tergitol L-64表面活性剂的CMIT/MIT制剂进行进行额外的稳定性测试以评价其长时间物理和化学相容性。测试在25℃, 40℃和55℃进行。结果显示, 2个月后, 除了Tergitol L-64+CMIT/MIT, 55℃储存的所有制剂显示优异的化学稳定性 (保留>95%最初浓度) 和物理外观 (澄清, 无沉淀或浑浊)。在含Surf. B和CMIT/MIT的制剂中观察到一些轻微泡沫和颜色。

[0051] 3个月的老化之后, 在55℃可见含Surf. A的CMIT活性成分的轻微损失 (94%保留)。在55℃可见含Surf. B的CMIT的中等损失 (89%保留) 和黄色变色。测试的所有其他组合显示优异的物理和化学相容性。

[0052] 6个月之后, 在室温老化的所有样品非常稳定且物理相容。如预期的那样, 对于一些制剂观察到升高的温度下杀生物剂的额外损失, 但是对于40℃和55℃储存6个月而言, 这是可以接受的。

[0053] 储存2个月的杀生物剂稳定性和相容性

[0054]

样品	% CMIT	% MIT	% 活性成 分总量	% CMIT 保留	% MIT 保留	外观
Surf. A + CMIT/MIT 25°C	1.134	0.375	1.51	101%	101%	澄清
Surf. A + CMIT/MIT 40°C	1.140	0.374	1.51	101%	101%	澄清
Surf. A + CMIT/MIT 55°C	1.075	0.373	1.45	95%	101%	澄清
Tergitol L-64 + CMIT/MIT 25°C	1.132	0.374	1.51	101%	102%	澄清
Tergitol L-64 + CMIT/MIT 40°C	1.123	0.372	1.49	101%	102%	澄清
Tergitol L-64 + CMIT/MIT 55°C	0.174	0.251	0.43	16%	69%	黄色 ppt
CMIT/MIT 25°C	1.217	0.403	1.62	105%	105%	澄清
CMIT/MIT 40°C	1.186	0.392	1.58	102%	102%	澄清
CMIT/MIT 55°C	1.185	0.392	1.58	102%	102%	澄清
Surf. B + CMIT/MIT 25°C	1.131	0.374	1.51	100%	100%	澄清, 泡沫
Surf. B + CMIT/MIT 40°C	1.140	0.376	1.52	101%	100%	淡黄色, 泡沫
Surf. B + CMIT/MIT 55°C	1.081	0.376	1.46	95%	100%	澄清, 泡沫

[0055] Surf. A+CMIT/MIT初始浓度=1.133%CMIT+0.375%MIT

[0056] Surf. A+CMIT/MIT初始浓度=1.127%CMIT+0.371%MIT

[0057] Tergitol L-64+CMIT/MIT初始浓度=1.116%CMIT+0.365%MIT

[0058] CMIT/MIT初始浓度=1.163%CMIT+0.384%MIT

[0059] 储存3个月的杀生物剂稳定性和相容性

[0060]

样品	% CMIT	% MIT	% 活性 成分总 量	% CMIT 保留	% MIT 保留	外观
Surf. A + CMIT/MIT 25°C	1.137	0.378	1.51	101%	102%	澄清
Surf. A + CMIT/MIT 40°C	1.113	0.367	1.48	99%	99%	澄清
Surf. A + CMIT/MIT 55°C	1.057	0.361	1.42	94%	97%	澄清
Tergitol L-64 + CMIT/MIT 25°C	1.121	0.370	1.49	100%	101%	澄清
Tergitol L-64 + CMIT/MIT 40°C	1.091	0.364	1.46	98%	100%	澄清
Tergitol L-64 + CMIT/MIT 55°C	未检 测	未检 测	未检测	未检测	未检测	未检测
CMIT/MIT 25°C	1.212	0.401	1.61	104%	104%	澄清
CMIT/MIT 40°C	1.184	0.391	1.58	102%	102%	澄清
CMIT/MIT 55°C	1.212	0.414	1.63	104%	108%	澄清, 淡黄 色
Surf. B + CMIT/MIT 25°C	1.126	0.372	1.50	99%	99%	澄清,
Surf. B + CMIT/MIT 40°C	1.131	0.374	1.50	100%	100%	淡黄色, 泡 沫
Surf. B + CMIT/MIT 55°C	1.008	0.399	1.41	89%	106%	黄色

[0061] 储存6个月的杀生物剂稳定性和相容性

[0062]	样品	% CMIT	% MIT	%活性成分总量	% CMIT 保留	% MIT 保留	外观
	Surf. A + CMIT/MIT 25°C	1.152	0.382	1.53	102%	103%	澄清
	Surf. A + CMIT/MIT 40°C	1.085	0.360	1.44	96%	97%	澄清
	Surf. A + CMIT/MIT 55°C	0.922	0.357	1.28	82%	96%	淡黄色
	TERGITOL L-64 + CMIT/MIT 25°C	1.134	0.375	1.51	102%	103%	澄清
	TERGITOL L-64 + CMIT/MIT 40°C	0.974	0.365	1.34	87%	100%	澄清
	TERGITOL L-64 + CMIT/MIT 55°C	未检测	未检测	未检测	未检测	未检测	未检测
	CMIT/MIT 25°C	1.239	0.414	1.65	107%	108%	澄清
	CMIT/MIT 40°C	1.226	0.394	1.62	105%	103%	澄清
	CMIT/MIT 55°C	1.235	0.442	1.68	106%	115%	澄清
	Surf. B + CMIT/MIT 25°C	1.147	0.378	1.53	101%	101%	澄清, 泡沫
	Surf. B + CMIT/MIT 40°C	1.105	0.369	1.47	98%	99%	淡黄色, 泡沫
	Surf. B + CMIT/MIT 55°C	未检测	未检测	未检测	未检测	未检测	未检测

[0063] 与浮游生物细菌的协同测试

[0064] 进行高分辨率最小抑制浓度 (HRMIC) 研究以确定CMIT/MIT杀生物剂和表面活性剂单独使用和联用时的抑制水平。测试在标准实验室培养基中进行。30°C孵育24小时后检测结果。

[0065] 材料与amp;方法

[0066] 通过对广泛范围内的化合物浓度和比例进行测试来说明本发明的组合的协同作用。一种协同作用的测定是Kull, F.C.; Eisman, P.C.; Sylwestrowicz, H.D. 和Mayer, R.L. 在应用微生物学 (Applied Microbiology) 9:538-541 (1961) 中提出的工业可接受的方法, 该方法采用由下式确定的比例:

[0067] $Q_a/Q_A + Q_b/Q_B =$ 协同指数 (“SI”) 其中:

[0068] Q_A = 单用时产生终点的化合物A (第一组分) 的浓度 (化合物A的MIC或MBC), 其单位为ppm。

[0069] Q_a = 以混合物形式使用时产生终点的化合物A的浓度, 其单位为ppm。

[0070] Q_B = 单用时产生终点的化合物B (第二组分) 的浓度 (化合物B的MIC或MBC), 其单位为ppm。

[0071] Q_b = 以混合物形式使用时产生终点的化合物B的浓度, 其单位为ppm。

[0072] 当 Q_a/Q_A 和 Q_b/Q_B 之和大于1时, 说明具有拮抗作用。当该值等于1时, 表明加合作用, 当该值小于1, 证明有协同作用。SI越小, 特定混合物所显示的协同作用越大。杀微生物剂的最小抑制浓度 (MIC) 是在一组特定条件下测得的能够阻止所加入的微生物生长的最低浓度。

[0073] 采用配备高分辨率MIC组合测试方法的Biomek 2000工作站用96孔微量滴定板建

立测试,在一个测试板上提供两种杀微生物剂的多种组合。在加入葡萄糖-酵母提取物(M9GY)培养基的矿物盐中观察到无生长(抑制)的杀微生物剂的最低浓度定义为组合的最小抑制浓度(MIC)。

[0074] 采用绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) (ATCC 15442),阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*) (ATCC 13047)或肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*) ATCC 10031)的24小时老化培养的1:20稀释液进行测试。微量滴定板的每个孔加入20 μ l每种生物体纯的培养悬液,最终密度为 10^6 克隆形成单元(CFU)/毫升。

[0075] MIC板在30℃培养24小时,肉眼观察是否存在微生物生长(浊度)。用不同起始浓度的杀生物剂以增加显示抗微生物活性的可能的组合数量,在复孔中建立测试。抑制生长的杀微生物剂的最低浓度记录为MIC。所有杀生物剂结果以活性成分为基准以ppm(百万分之一)记录。

[0076] 结果表明,CMIT/MIT与Surf.A和Surf.B具有协同作用。下表中总结了协同指数值。单用表面活性剂显示在10,000ppm无抗菌活性。

[0077] 测试的所有三种菌株中均观察到CMIT/MIT和Surf.A的协同作用。Surf.B仅显示与CMIT/MIT对抗阴沟肠杆菌和肺炎杆菌的协同作用,但不对抗绿脓假单胞菌。

[0078] CMIT/MIT杀生物剂与Surf.A或Surf.B的协同结果的总结

[0079]	表面活性剂	协同指数值范围	协同比率(杀生物剂:表面活性剂)	观察到协同作用的菌株
	Surf. A	0.50 至 0.83	1/50 至 1/2	绿脓假单胞菌 阴沟肠杆菌 肺炎杆菌
	Surf. B	0.50 至 0.67	1/10 至 1/0.5	阴沟肠杆菌 肺炎杆菌

[0080] Surf.A和CMIT/MIT杀生物剂的协同作用

[0081]

微生物	Q _a ppm CMIT/MIT	Q _b ppm Surf. A	协同指数值	协同值 比率 (CMIT/MIT: Surf. A)
绿脓假单胞菌 实验 1	2	0	1.0	-
	1	10	0.50	1/10
	1	15	0.50	1/15
	0	>10,000	1.0	-
阴沟肠杆菌 实验 1	1	0	1.0	-
	0.8	5	0.80	1/6.3
	0.8	10	0.80	1/12.5
	0.5	15	0.50	1/30
	0.5	20	0.50	1/40
	0.5	25	0.50	1/50
	0	>10,000	1.0	-
肺炎杆菌实 验 1	1	0	1.0	-
	0.8	5	0.80	1/6
	0.8	10	0.80	1/13
	0.8	15	0.80	1/19
	0.8	20	0.80	1/25
	0.8	25	0.80	1/31
	0	>10,000	1.0	-
绿脓假单胞菌 实验 2	2	0	1.0	-
	1	4	0.50	1/4
	1	10	0.50	1/10
	0	>10,000	1.0	-
阴沟肠杆菌 实验 2	0.6	0	1.0	-
	0.5	1	0.83	1/2
	0.5	2	0.83	1/4
	0.5	6	0.83	1/6
	0	>10,000	1.0	-
肺炎杆菌 实验 2	1	0	1.0	-
	0.8	2	0.8	1/2.5
	0.8	4	0.8	1/5
	0	>10,000	1.0	-

[0082] Surf.B和CMIT/MIT杀生物的协同作用

[0083]

微生物	Q _a ppm CMIT/MIT	Q _b ppm Surf. B	协同指数	协同值 比率 (CMIT/MIT:Surf. B)
绿脓假单胞菌 实验 1	2	0	1.0	-
	2	>10,000	1.0	无协同
	0	>10,000	1.0	-
阴沟肠杆菌 实验 1	3	0	1.0	-
	2	4	0.67	1/2
	2	2	0.67	1/1
	2	1	0.67	1/0.5
	0	>10,000	1.0	-
肺炎杆菌 实验 1	2	0	1.0	-
	1	6	0.5	1/6
	1	8	0.5	1/8
	1	10	0.5	1/10
	0	>10,000	1.0	-

[0084] CMIT/MIT杀生物剂加表面活性剂的生物膜控制研究

[0085] 材料与方法

[0086] 采用生物膜模型系统来评价CMIT/MIT杀生物剂和表面活性剂处理(单独使用或联用)对于根除建立的生物膜的功效。该系统包括在含有1%胰酶解酪蛋白大豆肉汤的磷酸盐-缓冲盐水溶液(100毫升)中,在载玻片上生长生物膜。采用三种细菌的混合物(绿脓假单胞菌ATCC 15442,阴沟肠杆菌ATCC 13047和肺炎杆菌ATCC 10031)作为生物膜样品的接种物。搅拌的同时(150-200rpm)在30℃孵育24-48小时后,预生长的生物膜载玻片在磷酸盐缓冲盐水中清洗并转移至含合成冷却水(584mg/l CaCl₂-2H₂O),203mg/l MgCl₂-6H₂O,84mg/l NaHCO₃,5mg/l丙烯酸酯/盐聚合物和0.1%胰酶解酪蛋白大豆肉汤)的杀生物剂处理的接触溶液。限定的接触时间(4-24hr)之后,清洗生物膜,刮片并通过平板计数或采用胰酶解酪蛋白大豆肉汤(TSB)培养基的MPN确定存活细菌的活菌数。

[0087] 下面提供了数据,显示在表面活性剂的存在下CMIT/MIT杀生物剂的增加功效以控制细菌淤积。单独加入表面活性剂显示无生物膜控制,即使在升高浓度的情况下。因此,表面活性剂显示与CMIT/MIT在控制表面上细菌淤积方面的协同功效。通常,与对照或另一处理相比至少0.5个log单位的对数降低的增加是可测量的改善的证据。

[0088] 对于CDC生物膜反应器研究,基于ASTM E2562-07的规程采用CDC生物膜反应器,只是有以下例外:

[0089] 1.菌株从绿脓假单胞菌改变至包括嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila* ATCC BAA74)、嗜肺军团菌宿主生物体(*Legionella*-host organism)阿米巴(*Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461)和未定义的环境细菌生物体。环境生物体和嗜肺军团菌源自细胞悬液。

[0090] 2.批料相(孵育而不流动)延长超过24小时至5天以支持嗜肺军团菌较慢的生长速率。

[0091] 3.为了反映与冷却塔环境相关的条件,培养基改变为合成冷却水,并且采用较慢速率的培养基流以反映较慢的嗜肺军团菌生长速率。

[0092] 4. 处理方案还包括加入24小时采用BCDMH-卤代水(0.6ppm有效氯)的后处理冲洗,以检测初始剂量之后加入的现实的维持剂量下靶向的杀生物剂如何影响试样中活的连接的生物膜。

[0093] 5. 取样改变,除去预先取样清洗步骤,去除步骤10.3.4-10.4.2并用剧烈涡旋步骤代替以去除待测试的试样中的生物膜。嗜肺军团菌计数并非复孔进行。

[0094] 实施例6.

[0095] 与未处理的对照相比,在细菌淤积控制方面CMIT/MIT杀生物剂(1.5ppm活性成分;a.i.)单独显示2.3对数降低(4小时)和0.7对数降低(24小时)。与未处理的对照相比,15ppm活性成分的Surf.A,B和C单独测试显示表面上细菌淤积不降低。与CMIT/MIT单独处理相比,CMIT/MIT与Surf.A,B或C(1:10重量比)的组合均显示改善的细菌生物膜控制。因此,这些表面活性剂能够改善CMIT/MIT杀生物剂对细菌生物膜生长的控制,而单独测试时没有这种控制作用。

[0096]

处理	样品 时间	生物膜 对数生长 细胞/平方 厘米	与未处理对照 相比的对数降 低
未处理对照	4 小时	6.2	0.0
	24 小时	6.8	0.0
1.5 ppm 活性成分 CMIT/MIT	4 小时	4.0	2.3
	24 小时	5.1	1.7
15 ppm 活性成分 Surf. C	4 小时	6.4	-0.2
	24 小时	6.6	0.2
15 ppm 活性成分 Surf. B	4 小时	7.5	-1.3
	24 小时	6.5	0.3
15 ppm 活性成分 Surf. A	4 小时	6.3	-0.1
	24 小时	6.8	0.0
1.5 ppm 活性成分 CMIT/MIT 和 15 ppm 活 性成分 Surf. C	4 小时	2.8	3.4
	24 小时	4.5	2.2
1.5 ppm 活性成分 CMIT/MIT 和 15 ppm 活性成分 Surf. B	4 小时	3.0	3.3
	24 小时	4.4	2.4
1.5 ppm 活性成分 CMIT/MIT 和 15 ppm 活 性成分 Surf. A	4 小时	3.6	2.6
	24 小时	4.4	2.4

[0097] 实施例7.

[0098] 与未处理的对照相比,在细菌淤积控制方面CMIT/MIT杀生物剂(1.5ppm活性成分;a.i.)单独显示1.2对数降低(4小时)和2.2对数降低(24小时)。

[0099] 与CMIT/MIT单独处理相比,1.5ppm CMIT/MIT与5ppm Surf.B和Surf.A(1:3.3重量比)的组合均显示改善的细菌生物膜控制。

[0100] 在该测试中,Surf.C与CMIT/MIT的组合显示细菌控制无改善,但Surf.A在24小时处理的生物膜样品中显示无活的细菌。因此,Surf.A和B能够改善CMIT/MIT杀生物剂对细菌生物膜生长的控制。

	处理	样品 时间	生物膜对数生 长细胞/平方 厘米	与未处理对照相比 的对数降低
	未处理对照	4 小时	6.4	0.0
[0101]		24 小时	6.9	0.0
	1.5 ppm 活性成分 CMIT/MIT	4 小时	5.2	1.2
		24 小时	4.7	2.2
	1.5 ppm 活性成分 CMIT/MIT + 5 ppm ai. Surf. C	4 小时	4.9	1.4
		24 小时	4.5	2.4
	1.5 ppm 活性成分 CMIT/MIT + 5 ppm 活性成分 Surf. B	4 小时	3.6	2.8
		24 小时	4.0	2.9
	1.5 ppm 活性成分 CMIT/MIT + 5 ppm 活性成分 Surf. A	4 小时	3.7	2.7
		24 小时	1.8*	>5.1

[0102] *检测限=没有回收到活的细胞

[0103] 实施例8.

[0104] 与未处理的对照相比,在细菌淤积控制方面CMIT/MIT杀生物剂(1.5ppm活性成分;a.i.)单独显示2.3对数降低(4小时)和2.5对数降低(24小时)。

[0105] Surf.A(5ppm活性成分)与CMIT/MIT(1.5ppm)(1:3.3重量比的杀生物剂:表面活性剂)显示与CMIT/MIT单独处理相比改善的细菌生物膜控制。

[0106]

处理	样品 时间	生物膜对 数生长相 比/平方厘 米	与未处理对 照相比的对 数降低
未处理对照	4 小时	4.5	0.0
	24 小时	5.3	0.0
1.5 ppm 活性成分 CMIT/MIT	4 小时	2.2	2.3
	24 小时	2.8	2.5
1.5 ppm 活性成分 CMIT/MIT + 5 ppm 活性成分 Surf. A	4 小时	1.5	3.0
	24 小时	2.1	3.2

[0107] *检测限=没有回收到活的细胞

[0108] 实施例9.

[0109] 与未处理对照相比,单独使用1.5和3ppm活性成分的CMIT/MIT杀生物剂在4至24小时之后显示在细菌生物膜生长方面1.4至2.3对数降低。24小时接触之后,与CMIT/MIT单独处理相比,CMIT/MIT和Surf. A (1:3.3重量比)的组合显示改善的细菌生物膜控制。仅用50ppm活性成分的Surf. A没有观察到细菌控制。因此,该表面活性剂能够改善CMIT/MIT杀生物剂对细菌生物膜生长的控制(在该杀生物剂的正常剂量范围内),而单独测试时没有这种控制作用。

[0110]

处理	样品 时间	生物膜对数生长 细胞/平方厘米	与未处理对照相 比的对数降低
未处理对照	4 hr	6.6	0.0
	24 hr	6.9	0.0
1.5 ppm 活性成分 CMIT/MIT	4 hr	4.5	2.0
	24 hr	5.5	1.4
3 ppm 活性成分 CMIT/MIT	4 hr	5.1	1.5
	24 hr	4.7	2.3
1.5 ppm 活性成分 CMIT/MIT + 5 ppm 活性成分 Surf. A	4 hr	5.2	1.4
	24 hr	4.5	2.4

[0111]

3 ppm 活性成分 CMIT/MIT + 10 ppm 活性成分 Surf. A	4 hr	5.4	1.1
	24 hr	2.9	4.0
50 ppm Surf. A	4 hr	7.4	-0.9
	24 hr	6.8	0.2

[0112] 实施例10.

[0113] 如上文材料和方法部分所述,在CDC生物膜反应器中评价对抗包含嗜肺军团菌的

混合环境样品的处理。

[0114]	处理	样品 时间	嗜肺军团 菌生物膜 对数生长 细胞/平方 厘米	与未处理对 照相比的嗜 肺军团菌对 数降低
	1.5 ppm 活性成分 CMIT/MIT	0 小时	2.72	0
		24 小时	2.66	0.06
		72 小时	2.57	0.15
		96 小时	0	2.27
		7 天	0	2.72
	1.5 ppm 活性成分 CMIT/MIT + 5 ppm 活性成分 Surf. A	0 小时	2.81	0
		24 小时	1.6	1.21
		72 小时	1.6	1.21
		96 小时	0	2.81
		7 天	2.2	0.61

[0115] 实施例11-评价较低比率的表面活性剂:CMIT/MIT

[0116] 采用四种不同的表面活性剂(Tergitol L-61,Tergitol L-64,Surfactant B和 Surfactant A),各自为3%或1.5%,制备了一系列样品。每种制剂包含约11%of KATHON™ CF 1400杀生物剂,最终活性成分的浓度为1.5%CMIT/MIT。制剂的其余部分是去离子水。加水而非表面活性剂来制备对照样品。由KATHON™WT制备未稳定对照,其不含稳定其他制剂的任何碘。

[0117] 在零时间以及随后的4周每周分析每个样品KATHON™ CF 1400 (CMIT和MIT) 中活性成分的水平。总的活性成分的水平是CMIT和MIT浓度之和。样品由高效液相色谱 (HPLC) 进行分析。

[0118] 制备样品并在零时间分析CMIT和MIT水平以确保所有样品的正确剂量。分析之后,将样品分成三个试管—一个在25℃热老化,一个在40℃热老化,一个在55℃热老化。

[0119] 表1. 零时间CMIT/MIT和表面活性剂样品的活性成分分析

[0120]

样品	CMIT	MIT	总的 活性 成分	活性 成分 比率	Mg(NO ₃) ₂
CMIT/MIT (无稳定剂)	1.137	0.376	1.51	75.2	2.3
CMIT/MIT (含稳定剂)	1.195	0.394	1.59	75.2	2.3
CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.150	0.379	1.53	75.2	2.3
CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.120	0.369	1.49	75.2	2.3
CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.151	0.379	1.53	75.2	2.3
CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.146	0.377	1.52	75.3	2.3
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	1.201	0.395	1.60	75.3	2.3
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	1.190	0.392	1.58	75.2	2.3
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.144	0.376	1.52	75.3	2.3
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.146	0.378	1.52	75.2	2.3

[0121] 热老化之后持续四周每周分析样品以检测稳定性。

[0122] 表2. 热老化一周后CMIT/MIT和表面活性剂样品的活性成分分析

[0123]

温度 (°C)	样品	CMI T	MIT	总的 活性 成分	活性 成分 比率	Mg(NO ₃) ₂
25	CMIT/MIT (无稳定剂)	1.145	0.378	1.52	75.2	2.3
25	CMIT/MIT (含稳定剂)	1.204	0.399	1.60	75.1	2.4
25	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.167	0.387	1.55	75.1	2.3
25	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.135	0.375	1.51	75.2	2.3
25	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.175	0.388	1.56	75.2	2.4
25	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.184	0.392	1.58	75.1	2.4
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	浑浊				
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	浑浊				
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.159	0.384	1.54	75.1	2.4
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.152	0.381	1.53	75.1	2.3
40	CMIT/MIT (无稳定剂)	1.092	0.376	1.47	74.4	2.3
40	CMIT/MIT (含稳定剂)	1.174	0.389	1.56	75.1	2.4
40	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.174	0.388	1.56	75.1	2.4
40	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.126	0.373	1.50	75.1	2.3
40	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.202	0.399	1.60	75.1	2.4
40	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.151	0.380	1.53	75.2	2.4
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	浑浊				
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	浑浊				
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.159	0.384	1.54	75.1	2.3
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.194	0.395	1.59	75.1	2.5
55	CMIT/MIT (无稳定剂)	0.928	0.373	1.30	71.3	2.3
55	CMIT/MIT (含稳定剂)	1.191	0.396	1.59	75.1	2.4
55	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	浑浊				
55	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	浑浊				
55	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.156	0.383	1.54	75.1	2.4
55	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.238	0.411	1.65	75.1	2.5
55	CMIT/MIT+TERGITOL L-61-1.5%	浑浊				
55	CMIT/MIT+TERGITOL L-61-3.0%	浑浊				
55	CMIT/MIT+TERGITOL L-64-1.5%	1.181	0.392	1.57	75.1	2.4
55	CMIT/MIT+TERGITOL L-64-3.0%	1.160	0.385	1.55	75.1	2.4

[0124] 含TERGITOL L-61的样品热老化一周后浑浊。含Surf. B的样品在55℃热老化一周后也浑浊。

[0125] 表3. 热老化两周后CMIT/MIT和表面活性剂样品的活性成分分析

[0126]

温度 (°C)	样品	CMI T	MIT	总的 活性 成分	活性 成分 比率	Mg(NO ₃) ₂
25	CMIT/MIT (无稳定剂)	1.155	0.382	1.54	75.2	N/A
25	CMIT/MIT (含稳定剂)	1.225	0.405	1.63	75.2	N/A
25	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.198	0.396	1.59	75.1	N/A
25	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.186	0.392	1.58	75.2	N/A
25	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.183	0.391	1.57	75.1	N/A
25	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.233	0.408	1.64	75.1	N/A
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	浑浊				
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	浑浊				
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.208	0.399	1.61	75.2	N/A
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.176	0.389	1.57	75.2	N/A
40	CMIT/MIT (无稳定剂)	1.000	0.381	1.38	72.4	N/A
40	CMIT/MIT (含稳定剂)	1.222	0.404	1.63	75.1	N/A
40	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.205	0.400	1.60	75.1	N/A
40	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.191	0.393	1.58	75.2	N/A
40	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.215	0.402	1.62	75.1	N/A
40	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.182	0.390	1.57	75.2	N/A
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	浑浊				
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	浑浊				
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.173	0.388	1.56	75.1	N/A
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.242	0.410	1.65	75.2	N/A
55	CMIT/MIT (无稳定剂)	0.708	0.382	1.09	64.9	N/A
55	CMIT/MIT (含稳定剂)	1.237	0.409	1.65	75.1	N/A
55	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	浑浊				
55	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	浑浊				
55	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.243	0.413	1.66	75.1	N/A
55	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.278	0.424	1.70	75.1	N/A
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	浑浊				
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	浑浊				
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.244	0.413	1.66	75.1	N/A
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.208	0.400	1.61	75.1	N/A

[0127] 在两周时间点由于宽峰无法分析Mg(NO₃)₂的水平。

[0128] 表4. 热老化三周后CMIT/MIT和表面活性剂样品的活性成分分析

[0129]

温度 (°C)	样品	CMI T	MIT	总的 活性 成分	活性 成分 比率	Mg(NO ₃) ₂
25	CMIT/MIT (无稳定剂)	1.155	0.383	1.54	75.1	2.4
25	CMIT/MIT (含稳定剂)	1.231	0.409	1.64	75.1	2.5
25	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.188	0.394	1.58	75.1	2.4
25	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.153	0.382	1.54	75.1	2.4
25	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.200	0.397	1.60	75.1	2.4
25	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.199	0.399	1.60	75.1	2.5
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	浑浊				
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	浑浊				
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.182	0.392	1.57	75.1	2.4
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.177	0.392	1.57	75.0	2.4
40	CMIT/MIT (无稳定剂)	0.804	0.374	1.18	68.2	2.3
40	CMIT/MIT (含稳定剂)	1.203	0.397	1.60	75.2	2.5
40	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.207	0.402	1.61	75.0	2.5
40	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.166	0.386	1.55	75.1	2.4
40	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.235	0.411	1.65	75.0	2.5
40	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.159	0.384	1.54	75.1	2.4
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	浑浊				
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	浑浊				
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.206	0.401	1.61	75.0	2.5
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.247	0.413	1.66	75.1	2.6
55	CMIT/MIT (无稳定剂)	0.413	0.333	0.75	55.4	2.2
55	CMIT/MIT (含稳定剂)	1.228	0.405	1.63	75.2	2.5
55	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	浑浊				
55	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	浑浊				
55	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.174	0.392	1.57	75.0	2.4
55	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.268	0.424	1.69	75.0	2.7
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	浑浊				
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	浑浊				
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.199	0.398	1.60	75.1	2.5
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.169	0.386	1.56	75.2	2.5

[0130] 表5.热老化四周后CMIT/MIT和表面活性剂样品的活性成分分析

[0131]

温度 (°C)	样品	CMIT	MIT	总的 活性 成分	活性 成分 比率	Mg(NO ₃) 2
25	CMIT/MIT (无稳定剂)	1.167	0.385	1.55	75.2	2.3
25	CMIT/MIT (含稳定剂)	1.263	0.415	1.68	75.3	2.5
25	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.180	0.390	1.57	75.2	2.4
25	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.155	0.382	1.54	75.2	2.4
25	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.199	0.396	1.59	75.2	2.4
25	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.207	0.400	1.61	75.1	2.5
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	浑浊				
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	浑浊				
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.202	0.395	1.60	75.3	2.4
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.173	0.389	1.56	75.1	2.4
40	CMIT/MIT (无稳定剂)	0.710	0.374	1.08	65.5	2.3
40	CMIT/MIT (含稳定剂)	1.198	0.394	1.59	75.2	2.4
40	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.202	0.397	1.60	75.2	2.5
40	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.170	0.386	1.56	75.2	2.4
40	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.236	0.409	1.65	75.1	2.5
40	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.159	0.381	1.54	75.3	2.4
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	浑浊				
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	浑浊				
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.191	0.392	1.58	75.2	2.4
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.221	0.402	1.62	75.2	2.5
55	CMIT/MIT (无稳定剂)	0.291	0.313	0.60	48.2	2.2
55	CMIT/MIT (含稳定剂)	1.204	0.398	1.60	75.2	2.4
55	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	浑浊				
55	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	浑浊				
55	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.185	0.392	1.58	75.2	2.4
55	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.251	0.414	1.66	75.2	2.7
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	浑浊				
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	浑浊				
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.201	0.398	1.60	75.1	2.5
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.157	0.382	1.54	75.2	2.5

[0132] 热老化四周之后,所有没有发生浑浊的样品相当稳定,除了未稳定的CMIT/MIT样品。

[0133] 表6. 在每个CMIT/MIT和表面活性剂混合物中热老化之后保留的总的活性成分的百分比。

[0134]

样品	温度 (°C)	保留的百分比				
		t = 0	t = 1 周	t = 2 周	t = 3 周	t = 4 周
CMIT/MIT (无稳定剂)	25	100	101	102	102	103
CMIT/MIT (含稳定剂)	25	100	101	108	103	106
CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	25	100	102	105	104	103
CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	25	100	101	104	103	103
CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	25	100	102	104	104	104
CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	25	100	104	108	105	106
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	25	浑浊				
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	25	浑浊				
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	25	100	102	106	104	105
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	25	100	101	103	103	103
CMIT/MIT (无稳定剂)	40	100	97	91	78	72
CMIT/MIT (含稳定剂)	40	100	98	107	101	100
CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	40	100	102	106	105	105
CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	40	100	101	105	104	104
CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	40	100	105	107	108	108
CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	40	100	101	104	101	101
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	40	浑浊				
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	40	浑浊				
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	40	100	102	103	106	104
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	40	100	104	109	109	107
CMIT/MIT (无稳定剂)	55	100	86	72	49	40
CMIT/MIT (含稳定剂)	55	100	100	109	103	101
CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	55	100	浑浊			
CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	55	100	浑浊			
CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	55	100	101	109	102	103
CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	55	100	108	113	111	109
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	55	浑浊				
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	55	浑浊				
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	55	100	103	110	105	105
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	55	100	101	106	102	101

[0135] 一些保留的百分比的值高于该样品记录的初始值。这可能是因为在热老化期间一些水分蒸发导致的。为了提供样品稳定性更正确的分析,在标准化至CMIT和MIT的起始浓度之前将总的活性成分的值标准化为 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 浓度。表7描述了这些结果。

[0136] 表7. 标准化至 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 之后每个样品中保留的活性成分的百分比以说明热老化过程期间的蒸发。

[0137]

样品	温度 (°C)	保留的百分比			
		t = 0	t = 1 周	t = 3 周	t = 4 周
CMIT/MIT (无稳定剂)	25	100	101	99	100
CMIT/MIT (含稳定剂)	25	100	96	94	95
CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	25	100	99	98	99
CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	25	100	102	100	100
CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	25	100	97	98	99
CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	25	100	99	98	98
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	25	浑浊			
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	25	浑浊			
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	25	100	99	98	99
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	25	100	99	97	99
CMIT/MIT (无稳定剂)	40	100	97	77	71
CMIT/MIT (含稳定剂)	40	100	95	92	95
CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	40	100	99	97	98
CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	40	100	100	98	100
CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	40	100	98	98	99
CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	40	100	96	98	98
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	40	浑浊			
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	40	浑浊			
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	40	100	99	93	94
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	40	100	97	93	93
CMIT/MIT (无稳定剂)	55	100	85	51	42
CMIT/MIT (含稳定剂)	55	100	94	94	95
CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	55	100	浑浊		
CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	55	100	浑浊		
CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	55	100	97	97	97
CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	55	100	98	93	94
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	55	浑浊			
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	55	浑浊			
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	55	100	98	96	94
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	55	100	98	95	94

[0138] 在55℃一个月所有保持澄清的样品均是稳定的,除了未稳定的CMIT/MIT样品。未计算t=2周时保留的百分比,因为在该时间点未能正确计算Mg(NO₃)₂水平。

[0139] 实施例12-1:1CMIT/MIT:表面活性剂组合的功效

[0140] 培养基

[0141] 胰酶解酪蛋白大豆肉汤琼脂 (TSBA)

[0142] 称取30g胰酶解酪蛋白大豆肉汤(迪菲克公司(Difco))和15g琼脂(迪菲克公司(Difco))置于2升烧瓶中。

[0143] 加入1000毫升去离子水。

[0144] 在121℃高压灭菌20分钟。

[0145] 将25毫升TSBA倒入无菌板(VWR)中。

[0146] 马铃薯葡萄糖肉汤(PDB)

- [0147] 称取24g马铃薯葡萄糖肉汤(迪菲克公司)置于2升烧瓶中。
- [0148] 加入1000毫升去离子水。
- [0149] 充分混合,煮沸1分钟。
- [0150] 在121℃高压灭菌20分钟。
- [0151] 萨布罗右旋糖琼脂(SDA)
- [0152] 称取195g萨布罗右旋糖琼脂(迪菲克公司)置于2升烧瓶中。
- [0153] 加入1000毫升去离子水。
- [0154] 充分混合,煮沸1分钟。
- [0155] 在121℃高压灭菌20分钟。
- [0156] 在水浴中冷却,然后将100μl庆大霉素(西格玛公司(Sigma))和100μl链霉素(西格玛公司(Sigma))加入培养基中。
- [0157] 将25毫升SDA倒入无菌板(VWR)中。
- [0158] 胰酶解酪蛋白大豆肉汤(TSB)
- [0159] 称取30g胰酶解酪蛋白大豆肉汤(迪菲克公司)置于2升烧瓶中。
- [0160] 加入1000毫升去离子水。
- [0161] 在121℃高压灭菌20分钟。
- [0162] Alga-Gro浓缩培养基
- [0163] 称取0.3g琼脂(迪菲克公司)置于100ml烧瓶中。
- [0164] 加入60毫升去离子水。
- [0165] 在121℃高压灭菌20分钟。
- [0166] 冷却。
- [0167] 加入1.2ml Alga-Gro浓缩培养基(卡罗来纳生物供应公司(Carolina Biological Supply))
- [0168] 方法
- [0169] 高分辨率最小抑制浓度评价
- [0170] 微生物
- [0171] 以下测试的微生物来自美国典型培养物保藏中心(ATCC;美国弗吉尼亚州马纳萨斯)。

	菌株	来源	
	绿脓假单胞菌	ATCC 15442	15
[0172]	金黄色葡萄球菌	ATCC 6538	
	白色念珠菌	ATCC 2091	
	酿酒酵母(<i>Sacchromyces cerevisiae</i>)	ATCC 18824	
	小球藻(<i>Chlorella sp.</i>)	ATCC 30582/UTEX 26	

[0173] 培养维持

- [0174] 细菌在TSBA上于30℃生长48小时。真菌在SDA上于25℃生长48小时。每个板用大约5mL磷酸盐缓冲液(pH7.2)洗涤。将培养悬液与等体积的无菌50%丙三醇混合。所得悬液以1毫升分配到2毫升的冷冻管中,于-70℃储存。在测试之前从冻结的冷冻管回收微生物。细菌

在TSBA上于30℃生长48小时。真菌在SDA上于30℃生长48小时。

[0175] 藻类在液体培养基 (Bo1d' s 3N培养基) 上生长和维持。收集藻类, 600g离心6分钟, 重悬在培养基中。藻类混合, 100uL置于含杀微生物剂的琼脂板上。板在30℃恒定光下进行孵育。

[0176] 为了制备琼脂培养基: 20g的Bacto琼脂加入980mL dH₂O中, 121℃高压灭菌30分钟, 置于50℃水浴中, 然后每升加入20mL的Bo1d' s 3N (50X储备液)。琼脂的一部分无菌转移至无菌烧瓶中, 烧瓶中加入所需用量的杀微生物剂, 然后将琼脂倒入皮氏培养皿。皮氏培养皿装有约20毫升含有杀生物剂的最终琼脂培养基。

	使用的装置和设备	
	装置/设备	品牌/型号
[0177]	分析天平	沙多利斯(Sartorius)
	培养箱	实验在线设备有限公司(Lab-Line Instruments, Inc.)
	高压灭菌器	Amsco
	紫外/可见分光计	Spectronic 20 GENESYS

[0178] 通过高分辨率最小抑制浓度 (HRMIC) 测试确定抑制细菌和真菌所需的杀微生物剂的最低浓度。在96孔微量滴定板中, 将各种用量的每种杀微生物剂加入培养基中。用于HRMIC测试的培养基是胰蛋白酶解酪蛋白大豆肉汤 (TSB) (对于细菌) 和马铃薯葡萄糖肉汤 (PDB) (对于真菌)。固定相细菌在TSB中, 在旋转振摇培养箱 (125次往复/分钟) 中于30℃生长过夜。制备真菌的磷酸盐缓冲悬液并稀释至PDB。过夜培养校准至0.40的OD值以确保约约 1.0×10^8 cfu/mL的起始细菌悬液。在合适的测试培养基中进行合适的稀释, 接种到测试孔, 对于细菌是每孔约 10^6 CFU/mL, 对于真菌是每孔约 10^5 CFU/mL。对于所有生物体制备三份细胞悬液。微量滴定板30℃孵育24小时 (对于细菌) 和25℃孵育7天 (对于真菌), 然后通过观察每个孔的浊度检查是否存在微生物生长。藻类在液体培养基 (Bo1d' s 3N培养基) 中生长和维持。收集藻类, 600g离心6分钟, 重悬在培养基中。藻类混合, 100uL置于含杀微生物剂的琼脂板上。板在30℃恒定光下进行孵育。孵育之后, 肉眼观察并且与对照板进行比较, 检查包含杀生物剂的琼脂板上的生长。显示无生长的第一微量滴定孔中化合物的浓度是杀微生物剂的最小抑制浓度 (MIC)。高分辨率MIC测试比常规的双重MIC测试更准确, 因为终点紧密间隔, 允许测试的化合物之间的更大差异化。由三种不同的接种物测试取平均测定每种杀微生物剂的MIC值, 每种接种物分三份, 分别对应于细菌、真菌和藻类。

[0179] HRMIC测试中CMIT/MIT的浓度 (ppm活性成分)

[0180]

1.5% CMIT/MIT				1.5% CMIT/MIT + Surf. A			
1	2	3	4	5	6	7	8
15.0	1.50	0.150	0.015	15+15	1.50+1.50	0.15+0.15	0.015+0.015
12.0	1.20	0.120	0.012	12+12	1.20+1.20	0.12+0.12	0.012+0.012
9.0	0.90	0.090	0.009	9+9	0.90+0.90	0.09+0.09	0.009+0.009
7.5	0.75	0.075	0.0075	7.5+7.5	0.75+0.75	0.075+0.075	0.0075+0.0075
6.0	0.60	0.060	0.0060	6+6	0.60+0.60	0.06+0.06	0.006+0.006
4.5	0.45	0.045	0.0045	4.5+4.5	0.45+0.45	0.045+0.045	0.0045+0.0045
3.0	0.30	0.030	0.0030	3+3	0.30+0.30	0.03+0.03	0.003+0.003
0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.000

[0181] 采用含有BoId's 3N培养基的琼脂皮氏培养皿进行绿藻菌株的MIC测试。选择该培养基是因为其最适合藻类生长。将CMIT/MIT 1.5%杀微生物剂和CMIT/MIT, 1.5%+Surf. A的掺混物(“1:1混合物”)加入琼脂培养基中, 以提供0.75, 1.5, 3.0, 6.0, 和12.0ppm活性成分。

[0182] 通过收集藻类, 在600g离心6分钟并重悬在培养基中, 制备藻类接种物。在含有各种浓度的杀生物剂的琼脂板的表面上划线100μL量的每周老化的藻类培养液并在光亮培养箱中30℃进行孵育。30℃7天孵育之后抑制琼脂表面上的藻类生长(可视的绿质外观)的杀生物剂的最低浓度是MIC。样品一式三份进行测试。

[0183] 1.5%CMIT/MIT+1.5%Surf. A(“1:1混合物”)的抗微生物活性

[0184] 如上所述, 在TSB或PDB中, 采用高分辨率MIC方法, 测定1:1混合物和1.5%CMIT/MIT对细菌混合物(实验1, 2和3)或真菌混合物(4, 5和6)的MIC值。如上所述, 在Bacto琼脂中采用琼脂板MIC方法测定1:1混合物和1.5%CMIT/MIT对藻类的MIC值。结果表明, 1:1混合物和1.5%CMIT/MIT是高度有效的杀微生物剂, 能够在低浓度下抑制微生物生长。此外, 1:1混合物的MIC类似于1.5%CMIT/MIT的MIC。MIC研究中“ppm活性成分”表示测试条件下存在的CMIT/MIT的量。

[0185] 实验1:1:1混合物和1.5%CMIT/MIT对细菌的MIC

[0186]

微生物	1:1 混合物		1.5% CMIT/MIT	
	MIC (ppm 活性成分)	SD (+/-)	MIC (ppm 活性成分)	SD (+/-)
绿脓假单胞菌 (ATCC 15442)和金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)	0.3	0	3	0

[0187] 实验2:1:1混合物和1.5%CMIT/MIT对细菌的MIC

[0188]

微生物	1:1 混合物		1.5% CMIT/MIT	
	MIC (ppm 活性成分)	SD (+/-)	MIC (ppm 活性成分)	SD (+/-)
绿脓假单胞菌 (ATCC 15442)和金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)	0.3	0	4	0.87

[0189] 实验3:1:1混合物和1.5%CMIT/MIT对细菌的MIC

[0190]

微生物	1:1 混合物		1.5% CMIT/MIT	
	MIC (ppm 活性成分)	SD (+/-)	MIC (ppm 活性成分)	SD (+/-)
绿脓假单胞菌 (ATCC 15442)和金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)	0.3	0	3.5	0.87

[0191] 实验1:1:1混合物和1.5%CMIT/MIT对真菌的MIC

[0192]

微生物	1:1 混合物		1.5% CMIT/MIT	
	MIC (ppm 活性成分)	SD (+/-)	MIC (ppm 活性成分)	SD (+/-)
白色念珠菌 (ATCC 2091)和酿酒酵母 (ATCC 18824)	0.06	0	0.45	0

[0193] 实验2:1:1混合物和1.5%CMIT/MIT对真菌的MIC

[0194]

微生物	1:1 混合物		1.5% CMIT/MIT	
	MIC (ppm 活性成分)	SD (+/-)	MIC (ppm 活性成分)	SD (+/-)
白色念珠菌 (ATCC 2091) 和 酿酒酵母 (ATCC 18824)	0.045	0	3	0

[0195] 实验3:1:1混合物和1.5%CMIT/MIT对真菌的MIC

[0196]

微生物	1:1 混合物		1.5% CMIT/MIT	
	MIC (ppm 活性成分)	SD (+/-)	MIC (ppm 活性成分)	SD (+/-)
白色念珠菌 (ATCC 2091) 和 酿酒酵母 (ATCC 18824)	0.06	0	0.65	0.087

[0197] 1:1混合物和1.5%CMIT/MIT对藻类的MIC

[0198] 普通小球藻(*Chlorella vulgaris* (ATCC 30582))

[0199]

杀微生物剂浓度 (ppm 活性成分)	复孔中的生长观察					
	复孔 1		复孔 2		复孔 3	
	CMIT/ MIT	1:1 混合物	CMIT/MIT	1:1 混合物	CMIT/ MIT	1:1 混合物
0 (对照)	+	+	+	+	+	+
0.75	-	-	-	-	-	-
1.5	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-

[0200] 测定所有复孔上无生长的MIC值。