

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 912644 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **912644**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**A01N 35/00
C02F 1/50**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **01.12.1989**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **31.05.1991**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **31.05.1991**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **01.12.1989 PCT/GB1989/001436**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

02.12.1988 GB 8828246

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • British Technology Group Limited, 101 Newington Causeway, London SE1 6BU, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Wrench, Eric, Bury St. Edmunds, Suffolk IP28 7AY, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Boco IP Oy Ab, Itämerenkatu 5, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Antimikrobinen aine

Antimikrobiskt medel

Mikrobeja torjuva aine
Antimikrobiskt medel

Keksinnön kohteena ovat mikrobeja torjuvat aineet ja erityisesti tällaiset aineet ja niiden käyttö bakteerikasvun säätelämiseksi sellaisissa paikoissa kuten suurten rakennusten ilmanvaihtojärjestelmiin kuuluvissa jäähdytystorneissa, öljylähteiden anaerobisissa nesteissä sekä teollisuuslaitosten vesipohjaisissa lietteissä.

1,5-pentaanidialin (joka tunnetaan yleisesti glutaraldehydinä) käyttö desinfektioaineena on tunnettua. Teollisoikeuksilla suojatuista valmisteista voidaan mainita yhtiön BASF PROTECTOL (tavaramerkki) sekä yhtiön Union Carbide AQUICAR (tavaramerkki). Nämä tuotteet ovat olennaisesti glutaraldehydin vesiliuoksia. Niitä käytetään erityisesti bakteerikasvun hillitsemiseksi jäähdytystorneissa sekä anaerobisen bakteerin Desulfovibrio desulfuricans kasvun hillitsemiseksi öljylähdeympäristöissä.

Glutaraldehydi on kuitenkin suhteellisen reaktiivista ja näin ollen sen vaikutusteho heikkenee helposti, mikäli sitä ei säilytetä ja käytetä tietyllä tavalla. Kun lämpötila nousee suuremmaksi kuin noin 30 °C tai kun pH nousee suuremmaksi kuin noin 7, glutaraldehydi polymeroituu herkästi. Öljylähteen kuumassa ympäristössä vaikutustehon heikkeneminen on vakava ongelma ja aiheuttaa paljon lisäkustannuksia.

Glutaraldehydin rajoittamaton vapautuminen suurina pitoisuuksina on epätoivottavaa, koska se on biologisesti hyvin haitallista. Tilanteissa, joissa saastuttavien aineiden vapautumista rajoitetaan tiukasti, glutaraldehydiä voidaan käyttää vain äärimmäistä varovaisuutta noudattaen.

Keksinnön tavoitteena on glutaraldehydin mikrobeja torjuvan vaikutustehon hyväksikäyttö taloudellisemmin ja siten, että ympäristövahinkojen vaara on pienempi.

Keksinnön ensimmäisen piirteen mukaisesti aikaan saadaan menetelmä bakteerikasvun hillinnän ylläpitämiseksi nestetilavuudessa, menetelmän ollessa tunnettu vaiheistaan, joissa:

- i) nesteeseen lisätään eräs määrä vesiliukoisen aldehydin tai di-aldehydin bisulfiittiadditioyhdistettä; ja
- ii) tämä liuennut additioyhdiste saatetaan reaktiiviseen kosketukseen sellaisen aineen kanssa, joka aine vapauttaa mainittua aldehydiä tai di-aldehydiä mainitusta additioyhdisteestä.

Keksinnön toisen piirteen mukaisesti aikaan saadaan väkevässä muodossa oleva mikrobeja torjuva koostumus, jonka on tarkoitus laimentua nestetilavuudessa hallittua vapautumista varten bakteerien pitkäaikaiseksi hillitsemiseksi nestetilavuudessa, koostumuksen ollessa tunnettu siitä, että se käsittää aktiivisenä aineosana aldehydin tai di-aldehydin bisulfiittiadditioyhdistettä.

Mainittu nestetilavuus voi olla esimerkiksi rakennuksen ilmanvaihtojärjestelmään kuuluvassa jäähdytystornissa oleva vesitilavuus. Tällaisessa tapauksessa saattaa olla tarkoituksenmukaista lisätä additiokompleksi vesiliuoksena, joten aldehydi- tai di-aldehydikompleksin tulisi olla vesiliukoista. Pinta-aktiivisen aineen sisällyttäminen voi helpottaa kompleksin ja torjuttavan organismin välistä kosketusta. Jäähdytystornin toimiessa vesi joutuu tehokkaaseen kosketukseen ilmakehän hapen kanssa, jolloin kompleksi hapettuu aldehydiä tai di-aldehydiä vapauttaen, ja jolloin aldehydiä tai di-aldehydiä on läsnä vesitilavuudessa sen desinfektoimiseksi. Kuten jäljempänä osoitetaan, tämä additiokompleksi on osoittautunut tehokkaaksi Legionella pneumophila-mikrobia vastaan.

Nestetilavuus voi myös olla öljylähteessä, jossa Desulfovibrio desulfuricans-mikrobin läsnäolo on ongelma. Hakijan suorittamat kokeet ovat varmistaneet bisulfiittikompleksin tehokkuuden tämän bakteerin torjumista ajatellen. Saattaa olla, että De-

sulfovibrio desulfuricans käyttää kompleksin sulfiittisisältöä lopullisena elektronin vastaanottajana, minkä seurauksena vapautuu aldehydiä tai di-aldehydiä, joka sitten tappaa tehokkaasti tämän bakteerin. Tämän bakteerin hillitsemiseen käytetään tavanomaisesti glutaraldehydiä. Koska se on di-aldehydi, sen additiokompleksissa on kaksi bisulfiittiryhmää, jotka molemmat bakteerin on käytettävä ennen kompleksiin sitoutumattoman aldehydin vapautumista. Vaikutusteho voi riippua siitä, kuinka helposti additiokompleksissa läsnäolevaa sulfiittia on bakteerin saatavilla öljyn sisältämään sulfiittiin verrattuna, jota öljyn sisältämää sulfiittia bakteeri käyttäisi additiokompleksin puuttuessa.

Samalla tavalla tätä bisulfiittiadditiokompleksia voidaan käyttää jauhetusta kalsiumkarbonaatista saaduissa lietteissä, jotka ovat paperiteollisuudessa käytettyjä täyteaineita. Näissä tuotteissa esiintyy usein kontaminanttina Desulfovibrio desulfuricans, minkä seurauksena saadaan epämiellyttäviä lietteitä, jotka haisevat voimakkaasti rikkivedylle ja muille haitallisille tuotteille. Kompleksin lisääminen hyvin pienenä pitoisuutena estää tällaiset seuraukset. Näin ollen sen käyttö on suhteellisen taloudellista, kuitenkin tehokasta pitkien ajanjaksojen aikana, eikä se vaikuta juurikaan haitallisesti lietteeseen tai sen käyttöön muiden perinteisten bakterisidien lisäämiseen verrattuna.

Näissä kaikissa sovellutuksissa on arvokasta, että additiokompleksi on lämpöstabiilimpaa kuin kompleksiin sitoutumaton aldehydi tai di-aldehydi, ja sen polymeroituminen on epätodennäköisempää. Jäähdytystornissa tapahtuva hapettuminen toimii mekanismina, joka hitaasti vapauttaa kompleksiin sitoutumatonta biosidia vesitilavuuteen liuenneesta kompleksista. Öljylähdetilanteessa kompleksi voi säilyä äärettömän kauan bakteerikasvua hilliten, sen kuluessa ainoastaan silloin, kun läsnä on sitä käyttäviä, sulfaattia pelkistäviä bakteereita. Täten on todennäköistä, että mikrobeja torjuvaa ainetta kuluu vähemmän ja että sitä on lisättävä harvemmin kuluneen aineen täydentämi-

seksi. Alkuperäiset pitoisuudet ovat todennäköisesti pienempiä ja näin ollen saastevahinkojen vaara on vähäisempi, mikäli tällaista mikrobeja torjuvaa ainetta sisältävää nestettä pääsee vuotamaan ympäristöön.

Aldehydi-bisulfiittikompleksit valmistettiin seuraavalla menetelmällä:

Tarvittava määrä natriummetabisulfiittia liuotettiin veteen ja lämpötila asetettiin arvoon 40 °C. Tarvittava määrä aldehydiä lisättiin ja seosta sekoitettiin tunnin ajan. Kukin seos saatiin homogeeniseksi tämän tunnin aikana ja reaktio katsottiin täydelliseksi loppuunkuluneeksi. Erilliset kokeet on esitetty alla olevassa taulukossa 1. Koska bentsaldehydin liukoisuus on rajallinen, niin sitä käytettäessä reaktio toteutettiin 50 °C:ssa. Yhden tunnin kuluttua suurin osa bentsaldehydistä oli reagoanut.

Keksintöä havainnollistetaan seuraavilla esimerkeillä.

Esimerkki 1

Taulukossa 1 luetelluista aldehydeistä saatujen bisulfiittikompleksien mikrobeja torjuva aktiivisuus määritettiin 35 °C:ssa inkuboimalla koeputkia, joihin oli siirrostettu ajanhetkellä nolla sulfaattia pelkistäviä bakteereja, minkä jälkeen bakterisolujen kasvua seurattiin ajan funktiona.

Bakteerisiirrosteena käytettiin Desulfovibrio desulfuricans-viljelmää (NCIB 8307), jota oli kasvatettu ja viljelty 35 °C:ssa anaerobisissa olosuhteissa Postgates-alustaa käyttäen. Tämän kasvatusalustan koostumus on esitetty alla olevassa taulukossa 2.

Koeputkista oli muodostettu kolmen koeputken ryhmiä. Kukin vertailuputki sisälsi 20 ml seosta, joka käsitti Postgates-alustaa ja suolapitoista pelkistintä (9 g NaCl ja 0,1 g natriumtioglykolaattia litrassa tislattua vettä).

Kukin keksinnön mukainen putki sisälsi samoin 20 ml:n suuruisessa panoksessaan jotakin taulukossa 1 lueteltua bisulfiittikompleksia pitoisuutena 100, 1000 tai 5000 mg/l.

Kasvatusalustan mustumisesta todettava bakteerikasvu bakteerisiirrosta käsitävissä putkissa arvioitiin joka päivä.

Tietyllä ajanhetkellä läsnäolevien, sulfaattia pelkistävien bakteereiden lukumäärän kvantitatiivinen määrittäminen perustui todennäköisimmän lukumäärän (most probable numbers; MPN) menetelmään. Taulukossa 3 on esitetty kustakin seuratasta koeputkesta saadut tulokset siten, että kasvu on osoitettu merkinnällä (+) ja kasvun puuttuminen merkinnällä (-). Yksittäiset mikrobeja torjuvat aineet on tunnistettu taulukossa 1 käytetyillä lyhenteillä, joihin on liitetty kirjain B bisulfiittikompleksia käytettäessä.

Esimerkki 2

Taulukon 1 mukaisten bisulfiittikompleksien mikrobeja torjuva vaikutus pitoisuutena 5000 mg/l hiivaa (Saccharomyces cerevisiae), gram-positiivista bakteeria (Streptococcus faecalis) ja gram-negatiivista bakteeria (Escherichia coli) vastaan tutkittiin lisäämällä niitä koeputkissa oleviin soluviljelmiin ajanhetkellä nolla, minkä jälkeen putkia inkuboitiin jatkuvasti ravistellen ja solujen lukumäärä arvioitiin 5 ja 24 tunnin kuluttua. Tulokset on esitetty taulukossa 4 alkuperäisen bakteerisolupitoisuuden prosentuaalisena pienenemisenä.

Esimerkki 3

Glutaraldehydikompleksia verrattiin pelkkään glutaraldehydiin ilmahapetusta käyttäen ja käyttämättä pienimpään inhiboivaan pitoisuuteen perustuvalla kokeella (minimum inhibitory concentration; MIC), saksalaisia ohjeita ja Kelsey:n ja Sykes'in suosituksia noudattaen. Kokeet toteutettiin Legionella-bakteeri-

ria ja *Pseudomonas*-lajeja vastaan käyttäen seuraavia viljelyalustoja:

1. *Pseudomonas fluorescens* - Muellor Hinton-elatusalusta
2. *Legionella pneumophila* - Muellor Hinton-elatusalusta, sisältäen *Legionella* C7E-perustaa ja täydentäviä aineita.

Laimennosputkia inkuboitiin huoneen lämpötilassa *Pseudomonas*-bakteerin tapauksessa ja 35 °C:ssa *Legionella pneumophila*-bakteerin tapauksessa. Mitään putkia ei ravisteltu. Kokeista saadut tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa 5. Bakteerikasvu on osoitettu merkinnällä (+) ja sen puuttuminen merkinnällä (-).

Seuraavaksi selvitettiin glutaraldehydikompleksin vaikutus *Pseudomonas fluorescens*-bakteerin elinkelpoisuuteen vedessä ja rikastetussa elatusalustassa olosuhteissa, joissa käytettiin ilmahapetusta. Saadut tulokset on koottu alla olevaan taulukoon 6, jonka yläosa liittyy veteen ja alaosa rikastettuun elatusalustaan. Voimakas kasvu on osoitettu merkinnällä (+++), heikko kasvu merkinnällä (+) ja kasvun puuttuminen merkinnällä (-).

Esimerkki 4

Mueller-Hinton-elatusalusta absorboi biosidista kemiallista väliainetta. Kasvun mahdollinen pieneneminen bakteriostaattisuuskokeessa osoittaa biosidin aktiivisuuden. Täten jos suuren alkuperäisen solupitoisuuden tapauksessa todetaan vain pieniä pesäkkeitä, niin tämä on osoitus kasvun inhibitiosta ja biosidin aktiivisuudesta.

Aloitusalustaan siirrostetut ja yön yli 35 °C:ssa kasvatetut viljelmät laimennettiin tislatusvedellä. Testiorganismeina käytettyjen gram-negatiivisten (*Escherichia coli*) ja gram-positiivisten (*Streptococcus faecalis*) bakteereiden viljelmät laimennettiin suhteissa 1:100 ja 1:10 000 ja maljattiin Muel-

ler-Hinton-alustalle, joka sisälsi mainittuja biosideja erilaisina esitettyinä pitoisuuksina (mg/l). Maljoille levitettyjä viljelmiä inkuboitiin 35 °C:ssa. Escherichia coli-maljat luettiin 1 vuorokauden jälkeen ja Streptococcus faecalis-maljat luettiin 3 vuorokauden jälkeen. Tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa 7. Tässä taulukossa käytetyillä merkinnoilla on sama merkitys kuin aikaisemmissakin taulukoissa. "NN" tarkoittaa "liikaa pesäkkeitä laskettavaksi". "W" tarkoittaa "heikkoa kasvua" ja "WW" tarkoittaa "erittäin heikkoa kasvua".

Taulukosta nähdään, että glutaraldehydi- ja bentsaldehydi-bisulfiitti-kompleksit inhiboivat voimakkaasti Streptococcus faecalis-bakteerin kasvua ja ne inhiboivat hyvin, kuitenkin heikommin Escherichia coli-bakteerin kasvua. Muilla mikrobeja torjuvilla aineilla on kasvua inhiboivaa vaikutusta, joka ei ole kuitenkaan näin selvää.

Teolliset sovellutukset

Molekyyllipainoltaan pienestä aldehydistä tai di-aldehydistä saadun bisulfiittikompleksin käsittely on helpompaa ja se on vähemmän myrkyllistä vastaavaan vapaaseen aldehydiin verrattuna. Sen satunnainen vapautuminen aiheuttaa pienempiä ympäristöhaittoja ja se on lämpöstabiilimpaa ja se vastustaa paremmin polymeroitumista. Se voi kuitenkin torjua mikrobeja vähintään yhtä tehokasti kuin vapaa aldehydi tai di-aldehydi, koska siitä vapautuu helposti biologisesti vaikuttavaa vapaata aldehydiä esimerkiksi hapettumisen seurauksena tai itse mikrobin vaikuttaessa aldehydikompleksiin. Täten sillä voidaan saavuttaa sellaisia mikrobeja torjuvia vaikutuksia, jotka ovat verrattavissa jo käytössä olevien glutaraldehydikäsittelyjen tuloksiin, kuitenkin siten, että keksinnön mukaista mikrobeja torjuvaa ainetta kuluu vähemmän.

Biosidin vapautumisnopeus tietyn ajanjakson aikana esimerkiksi jääähdytystornin vesitilavuuteen riippuu yleensä bisulfiitti-

kompleksin hapettumisnopeudesta. Hapettumisnopeutta voi säädellä esimerkiksi se, miten voimakkaasti ja tehokkaasti vesi sekoittuu ympäröivään ilmaan. Täten, jos tavoitteena on oheisten bisulfiittiaineiden optimikäyttö, niin tuloksena voivat olla jäähdytystornin rakenteen ja toiminnan täsmällisemmät suunnitteluvaatimukset.

Normaalisti käytetään natrium- tai kaliumadditiokompleksia ja normaalisti aldehydi tai di-aldehydi valitaan siten, että saadaan moniin sovellutuksiin sopiva, vesiliukoinen bisulfiittiadditiokompleksi; jonka valmistus on halpaa ja käyttö helppoa.

TAULUKKO 1

ALDEHYDI (ja lyhenne)	Bisulfiitti- kompleksin DCOIN-no.	Erä no.	Käytetty määrä			Määrä/litra (g)		
			Aldehydi	Na HSO ₃	Vesi	Aldehydi	Na HSO ₃	Vesi
Bentsaldehydi (B-A)	4657.12.9	201089/4	108	80	1764	60.63	45.8	904.6
Glyoksaali (G-0)	517.21.5	201089/5	114.6	190	2325	54.37	71.2	874.18
Glutaraldehydi (G-A)	7420.89.5	201089/1	200	190	2690	65	61.75	874.25
Formaldehydi (F-A)	870.72.4	201089/2	166.5	190	2320	62.6	70.8	866.6
Asetaldehydi (A-A)	918.04.7	202089/3	88	190	2682	29.7	64.0	903.8

Taulukko 2

Postgates-elatusalusta

<u>Komponentti</u>	<u>Määrä (g)</u>
K ₂ HPO ₄	0,5
NH ₄ Cl	1,0
Na ₂ SO ₄	1,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,0
Natriumlaktaatti (70 % liuos)	5,0 ml
Hiivauute	1,0
Tislattu vesi	1000

Edellä mainituista komponenteista saatuun
perusalustaan lisätään:

Natriumtioglykollaattia	0,02
Natriumaskorbaattia	0,02
Rauta(II)sulfaattia	0,1

TAULUKKO 3

		Vrk							
Aine	Pitoisuus (mg/l)	1	3	4	5	6	7	10	12
Puuttuu (vertailu)	-	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
(G-A)B	5000	---	---	---	---	---	---	---	---
(G-A)B	1000	---	---	---	---	---	---	---	---
G-A	1000	---	---	---	---	---	---	---	---
(G-A)B	100	---	+-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
G-A	100	---	---	(±)---	(±)---	-(±)-	-(±)-	-(±)-	-(±)-
(B-A)B	5000	---	---	---	---	---	---	---	---
(B-A)B	1000	---	---	---	(±)++	+++	+++	+++	+++
B-A	1000	---	---	---	---	---	---	---	---
(B-A)B	100	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
B-A	100	---	---	(±)++	+++	+++	+++	---	+++
(A-A)B	5000	---	---	---	---	-(±)	---	---	---
(A-A)B	1000	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
(F-A)B	5000	---	---	---	---	---	---	---	---
(F-A)B	1000	---	---	---	---	---	---	---	---
(G-O)B	5000	---	---	---	---	---	---	---	---
(G-O)B	1000	---	(±)(±)-	(±)(±)-	(±)++	++(±)	++(±)	++(±)	+++

Taulukko 4

Organismi (alkup. pitoisuus solua/ml)	Kulunut aika (h)	Aldehydikompleksi				
		(G-A)B	(A-A)B	(G-O)B	(B-A)B	(F-A)B
Hiiva ($11,5 \times 10^5$)	5	21,1	34,6	18,7	87	0
	24	52,6	0	0	100	99,99
G + Ve	5	99,99	72,4	99,97	100	87,1
	24	100	91,1	100	100	0
G - Ve	5	87,1	58,7	79,6	82,6	0
	24	100	0	0	100	99,9

Taulukko 5

Biosidi		Ps. fluorescens-bakteerin kasvu 24 tunnin kuluttua							
Pitoisuus (mg/l)		0	200	400	500	1000	2000	4000	5000
Glutaraldehydi- kompleksi		+	+	+	+	+	+	+	+
50 % glutaraldehydi		+	+	-	-	-	-	-	-

Biosidi		Legionella:n kasvu, M+B-rikastus yhteensä 5 vrk:n kuluttua (2 vrk. 34 °C:ssa)							
Pitoisuus (mg/l)		0	200	400	500	1000	2000	4000	5000
Glutaraldehydi- kompleksi		+	+	-	-	-	-	-	-
50 % glutaraldehydi		+	+	+					

Taulukko 6

Kulunut aika	Kompleksin pitoisuus (mg/l)				
Vesi	0	200	1000	5000	10000
0	+++	+++	+++	+++	+++
4 tuntia	+++	+++	+++	+++	+++
8 tuntia	+	+	-	-	-
24 tuntia	-	-	-	-	-
48 tuntia	-	-	-	-	-
72 tuntia		-	-	-	-

Rikastettu alusta					
0	+++	+++	+++	+++	+++
4 tuntia	+++	+++	+++	+++	+++
8 tuntia	+++	+++	+		
24 tuntia	+++	+	+	+	+
48 tuntia	+++	-	-	-	-
72 tuntia	+++	-	-	-	-

TAULUKKO 7

BAKTEERI (pitoisuus)	VERTAILU	(G-A) B 5000	(G-A) B 1000	G-A 1000	(G-O) B 5000	(A-A) B 5000	(F-A) B 5000	(B-A) B 5000	B-A 1000
Escherichia coli 1:100	NN +++	NN +++	NN +++	NN +++	NN +++	NN +++	NN +++	NN +++	NN +++
Streptococcus faecalis 1:100	NN +++	-	NN +++	NN +	W	NN +++	WW	-	-
Escherichia coli 1:10,000	>10,000	6,000	NN >10,000	>6,000	NN >10,000	>6,000	>6,000	4,276	6,000
Streptococcus faecalis 1:10,000	5,444	-	8,024	581	W	1,000	WW	-	-

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä bakteerikasvun pitkäaikaiseksi hillitsemiseksi nestetilavuudessa, t u n n e t t u siitä, että se käsittää vaiheet, joissa:

- i) nesteeseen lisätään eräs määrä vesiliukoisen aldehydin tai di-aldehydin bisulfiittiadditioyhdistettä; ja
- ii) liuennut additioyhdiste saatetaan reaktiiviseen kosketukseen sellaisen aineen kanssa, joka aine vapauttaa mainittua aldehydiä tai di-aldehydiä mainitusta additioyhdisteestä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että neste on ilmanvaihtolaitoksen jäähdytystornissa olevaa vettä.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että neste on teollisessa valmistusprosessissa esiintyvää vesipohjaista lietettä.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että nestetilavuus on anaerobisessa ympäristössä.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että nestetilavuus on lähteen tai kaivon pohjalla.

6. Väkevässä muodossa oleva mikrobeja torjuva koostumus, jonka on tarkoitus laimentua nestetilavuudessa hallittua vapautumista varten bakteerikasvun pitkäaikaiseksi hillitsemiseksi tässä nestetilavuudessa, t u n n e t t u siitä, että se käsittää aktiivisena aineosana aldehydin tai di-aldehydin bisulfiittiadditioyhdistettä.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että additioyhdiste on saatu glutaraldehydistä.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että additioyhdiste on saatu bentsaldehydistä.

9. Väkevässä muodossa olevan, mikrobeja torjuvan koostumuksen käyttö, jonka koostumuksen on tarkoitus laimentua nestetilavuudessa hallittua vapautumista varten bakteerikasvun pitkäaikaiseksi hillitsemiseksi tässä nestetilavuudessa, t u n n e t t u siitä, että koostumus käsittää aktiivisena aineosana aldehydin tai di-aldehydin bisulfiittiadditioyhdistettä.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että additioyhdiste on saatu glutaraldehydistä.