



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106879602 A

(43)申请公布日 2017.06.23

(21)申请号 201710021161.2

(22)申请日 2017.01.11

(71)申请人 广东省微生物研究所(广东省微生物分析检测中心)

地址 510070 广东省广州市先烈中路100号大院56号

(72)发明人 周刚 施庆珊 彭红 黄小茱 谢小保

(74)专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限公司 44001

代理人 刘明星

(51)Int. Cl.

A01N 43/80(2006.01)

A01N 37/44(2006.01)

A01P 1/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物

(57)摘要

本发明公开了一种协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物。包括1,2-苯并异噻唑-3-酮和乙二胺四乙酸二钠。本发明的协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物对细菌浮游菌的生长及其生物膜的形成都有杀灭或者抑制作用,且这种杀灭或者抑制作用比单独使用任何一种组分都具有更好的效果,因此可以提高BIT药物的抑制细菌生长及其生物膜形成的效果,从而减少BIT的使用量和降低细菌产生抗药性的机率。

1. 一种协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物,其特征在于,包括1,2-苯并异噻唑-3-酮和乙二胺四乙酸二钠。

2. 根据权利要求1所述的协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物,其特征在于,所述的1,2-苯并异噻唑-3-酮和乙二胺四乙酸二钠是按物质的量之比为1:20~80复配而成。

3. 根据权利要求1所述的协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物,其特征在于,所述的协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物中的细菌是假单胞菌属 (*Pseudomonas* spp.)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter* spp.) 或者葡萄球菌属 (*Staphylococcus* spp.)。

4. 根据权利要求1所述的协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物,其特征在于,所述的细菌为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、魏氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter werkmanii*) 或者金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。

一种协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物

技术领域

[0001] 本发明属于化学和微生物领域,具体涉及一种协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物。

背景技术:

[0002] 异噻唑啉酮类防霉防腐剂是20世纪60年代左右开发使用的一种新型杀菌剂,具有高效、低毒、药效持续时间长、对环境安全等优点,被誉为新型环保型杀菌剂,市场占有率不断提高,引起了生物、医药、化学界等专家的广泛关注,并且此类杀菌剂已经被广泛的应用于海洋防污、工业循环冷却水处理、工业产品防腐、农用杀菌和日常洗化用品等方面,而原国家经贸委也早在2001年就将异噻唑啉酮杀菌灭藻剂列入《当前国家鼓励发展的节水设备(产品)目录(第一批)》(二00一年第5号)中的水处理药剂使用。1,2-苯并-异噻唑啉-3-酮(BIT)是异噻唑啉酮类防霉防腐剂的典型代表,该药物在工业环境中得到了广泛的应用,但由于该药物的长期和不正当使用,从而导致越来越多的微生物对其产生了抗性,由于抗性的产生从而导致洗发露、洗洁精和涂料等的腐败变质,给生产企业和使用者带来巨大的经济损失,甚至影响到人类的健康。而从头开发一种高效广谱性的化学药剂,则周期长,成本高,难度大,因此,迫切需要对现有的杀菌剂进行必要的复配或者添加药效促进成份等来提高杀菌剂的药效,从而降低防霉防腐剂的的实际使用剂量,减少环境污染和对人类健康的潜在负面影响。

[0003] 细菌生物膜(Bacterial biofilm,BF)是细菌的一种生存形式,有数据表明在自然界中高达95%的细菌都是以细菌生物膜的形式存在,它是一种附着于生物或非生物材料表面,被自身分泌的胞外大分子包裹并具有一定三维结构特点的细菌群体,其结构构成主要包括:水、细菌、大分子聚合物(蛋白质、多糖、DNA、RNA、肽聚糖、脂和磷脂等)、吸附的营养物质、代谢产物和细菌裂解产物等。由于生物膜的形成,从而导致细菌抗药性的产生,有研究表明,细菌生物膜的抗药性比其在浮游状态高10-1000倍。细菌生物膜的形成还会导致很多的危害,如对附着的材料表面产生腐蚀作用、污染医疗器械和引发人类疾病等,因此,如何控制及清理细菌生物膜成为一个热门的课题。目前,虽然开发出了许多新型的控制细菌生物膜形成和发展的方法以及药剂,但是,利用化学杀菌剂来控制生物膜仍然是最有效的手段,并将长期存在和使用,但与此同时,细菌生物膜对很多杀菌剂产生了抗性,从而使得普遍使用的杀菌剂及其施用浓度已经不能控制生物膜的形成,迫切需要开发出高效的杀菌剂或者复配物来抑制和灭杀细菌生物膜。

发明内容:

[0004] 本发明的目的是提供能够有效的抑制细菌生长及其生物膜形成的效果的协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物,该协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物能提高BIT药物的抑制细菌生长及其生物膜形成的效果,从而减少BIT的使用量和降低细菌产生抗药性的机率。

[0005] 本发明的协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物,其特征在于,包括1,2-苯并异噻唑-3-酮(BIT)和乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)。

[0006] 优选,所述的1,2-苯并异噻唑-3-酮(BIT)和乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)是按物质的量之比为1:20~80复配而成。

[0007] 所述的协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物中的细菌是假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter* spp.)或者葡萄球菌属(*Staphylococcus* spp.)等的细菌。

[0008] 进一步优选,所述的细菌为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、魏氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter werkmanii*)或者金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等。

[0009] 本发明的协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物对细菌浮游菌的生长及其生物膜的形成都有杀灭或者抑制作用,且这种杀灭或者抑制作用比单独使用任何一种组分都具有更好的效果,因此可以提高BIT药物的抑制细菌生长及其生物膜形成的效果,从而减少BIT的使用量和降低细菌产生抗药性的机率。

[0010] 本发明配方简单,配制容易,效果显著,应用范围和前景广阔。

具体实施方式

[0011] 以下实施例是对本发明的进一步说明,而不是对本发明的限制。

[0012] 测试方法范例

[0013] 以下实施例中的测试菌株都是用该实施例中普通Luria-Bertani (LB)液体培养基(每升含有氯化钠10g,胰蛋白胨10g,酵母粉5g)将测试菌株过夜培养,然后再用新鲜的LB液体培养基将过夜培养物稀释到 $OD_{600}=1.0$ 配制成菌悬液母液,并按照10%的体积分数接种量加入菌悬液母液,制成菌悬液工作液,同时按照梯度稀释的方法在培养体系中加入一定浓度的BIT以及EDTA-2Na,将BIT和EDTA-2Na以及菌悬液工作液充分混合均匀后,吸取150 μ l上述混合液到96孔细胞培养板中,然后将培养板放入30 $^{\circ}$ C或者37 $^{\circ}$ C恒温培养箱静置培养24小时,最后将96孔板取出,用全波长酶标仪测定菌液的在600nm处的吸光度值(OD_{600}),以此评价BIT和EDTA-2Na对细菌浮游菌的抑制效果;然后,轻轻的吸弃浮游菌,清洗板孔3次,并在每个板孔内加入200 μ l 1% (v/w)结晶紫染色液,静置染色30分钟,吸弃结晶紫染色液,再用无菌水洗板孔三次,室温干燥30min后,用200 μ l 95%的乙醇脱色30min,利用全波长酶标仪测其在595nm处的吸光度值(OD_{595}),以此评价BIT和EDTA-2Na对细菌生物膜形成的抑制效果。

[0014] 同时,协同作用的评价方法是使用Kull F.C.等(*Applied Microbiology*,1961 9:538-541)所述的工业上认同的经典方法即协同指数来判断杀菌剂的协同和拮抗作用。 SI (协同指数) $=Q_a/QA+Q_b/QB$,其中QA为化合物A(第一组分)单独使用时对菌株抑制的最小抑制浓度(MIC),单位为mM;QB为化合物B(第二组分)单独作用时所测定菌株的最小抑制浓度(MIC),单位为mM;Qa、Qb为混合物中化合物A、B的浓度,单位为mM。当 $SI>1$ 时,表示拮抗作用;当 $SI=1$ 时,表示相加性,而且 $SI<1$ 时表示协同作用,SI值愈低,该特定混合物显示的协同作用愈大。

[0015] 实施例1:

[0016] 一种协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物,用金黄色葡萄球菌

(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538) 作为测试菌株,按照上述测试方法范例中的方法进行测试,用96孔细胞培养板在37℃静置培养菌株24h,测定的BIT对*S.aureus* ATCC 6538的MIC为(即QA):0.4mM;测定的EDTA-2Na对*S.aureus* ATCC 6538的MIC为(即QB):64mM。在*S.aureus* ATCC 6538菌株培养液中加入BIT (Qa),使其终浓度为0.1mM,以及EDTA-2Na (Qb),使其终浓度为2mM,混合均匀(即96孔细胞培养板中的混合液中含有BIT 0.1mM和EDTA-2Na 2mM),BIT (Qa)和EDTA-2Na (Qb)就可有效抑制*S.aureus* ATCC 6538的生长,即未见明显生长,达到复配组合物对菌株生长的最小抑制浓度(MIC),利用上面提到的公式:SI(协同指数) $=Qa/QA+Qb/QB$,计算得到的 $SI=0.281$,即 $SI<1$,说明BIT和EDTA-2Na具有协同抑细菌复配增效作用;同时,用结晶紫染色法和全波长酶标仪测定菌株在0.1mM BIT和2mM EDTA-2Na复配组合物胁迫条件下的细菌生物膜形成能力,测得的 OD_{595} 均值为:0.132,与单独使用0.1mM BIT或者2mM EDTA-2Na相比,菌株生物膜形成能力(OD_{595} -BIT=0.602或 OD_{595} -EDTA-2Na=0.762),分别下降了78.07%或82.67%,由此可见,使用本发明所提供一种协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物培养金黄色葡萄球菌(*S.aureus* ATCC 6538),除了可以有效抑制该菌浮游菌的生长以外,也可以有效的抑制其细菌生物膜的形成。

[0017] 实施例2:

[0018] 一种协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物,用金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)作为测试菌株,按照上述测试方法范例中的方法进行测试,用96孔细胞培养板在37℃静置培养菌株24h,测定的BIT对*S.aureus* ATCC 6538的MIC为(即QA):0.4mM;测定的EDTA-2Na对*S.aureus* ATCC 6538的MIC为(即QB):64mM。而在*S.aureus* ATCC 6538菌株培养液中加入BIT (Qa),使其终浓度为0.1mM,以及EDTA-2Na (Qb),使其终浓度为4mM,然后混合均匀(即96孔细胞培养板中的混合液中含有BIT 0.1mM和EDTA-2Na 4mM),BIT (Qa)和EDTA-2Na (Qb)就可有效抑制*S.aureus* ATCC 6538的生长,即未见明显生长,达到复配组合物对菌株生长的最小抑制浓度(MIC),利用上面提到的公式:SI(协同指数) $=Qa/QA+Qb/QB$,计算得到的 $SI=0.313$,即 $SI<1$,说明BIT和EDTA-2Na具有协同抑细菌复配增效作用;同时,用结晶紫染色法和全波长酶标仪测定菌株在0.1mM BIT和4mM EDTA-2Na复配组合物胁迫条件下的细菌生物膜形成能力,测得的 OD_{595} 均值为:0.118,与单独使用0.1mM BIT或者4mM EDTA-2Na相比,菌株生物膜形成能力(OD_{595} -BIT=0.602或 OD_{595} -EDTA-2Na=0.756),分别下降了80.40%或84.39%,由此可见,使用本发明所提供一种协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物培养金黄色葡萄球菌(*S.aureus* ATCC 6538),除了可以有效抑制该菌浮游菌的生长以外,也可以有效的抑制其细菌生物膜的形成。

[0019] 实施例3:

[0020] 一种协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物,用金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)作为测试菌株,按照上述测试方法范例中的方法进行测试,用96孔细胞培养板在37℃静置培养菌株24h,测定的BIT对*S.aureus* ATCC 6538的MIC为(即QA):0.4mM;测定的EDTA-2Na对*S.aureus* ATCC 6538的MIC为(即QB):64mM。而在*S.aureus* ATCC 6538菌株培养液中加入BIT (Qa),使其终浓度为0.1mM,以及EDTA-2Na (Qb),使其终浓度为8mM,然后混合均匀(即96孔细胞培养板中的混合液中含有BIT 0.1mM和EDTA-2Na 8mM),BIT (Qa)和EDTA-2Na (Qb)就可有效抑制*S.aureus* ATCC 6538的生长,即未见明显生长,达到复配组合物对菌株生长的最小抑制浓度(MIC),利用上面提到的公式:SI(协同指

数) = $Q_a/QA+Q_b/QB$, 计算得到的 $SI=0.375$, 即 $SI<1$, 说明 BIT 和 EDTA-2Na 具有协同抑细菌复配增效作用; 同时, 用结晶紫染色法和全波长酶标仪测定菌株在 0.1mM BIT 和 8mM EDTA-2Na 复配组合物胁迫条件下的细菌生物膜形成能力, 测得的 OD_{595} 均值为: 0.116 , 与单独使用 0.1mM BIT 或者 8mM EDTA-2Na 相比, 菌株生物膜形成能力 ($OD_{595}\text{-BIT}=0.602$ 或 $OD_{595}\text{-EDTA-2Na}=0.742$), 分别下降了 80.73% 或 84.37% , 由此可见, 使用本发明所提供的一种协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物培养金黄色葡萄球菌 (*S.aureus* ATCC 6538), 除了可以有效抑制该菌浮游菌的生长以外, 也可以有效的抑制其细菌生物膜的形成。

[0021] 实施例4:

[0022] 一种协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物, 用铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) 作为测试菌株, 按照上述测试方法范例中的方法进行测试, 用 96 孔细胞培养板在 30°C 静置培养菌株 24h, 测定的 BIT 对 *P.aeruginosa* ATCC 9027 的 MIC 为 (即 QA): 0.56mM ; 测定的 EDTA-2Na 对 *P.aeruginosa* ATCC 9027 的 MIC 为 (即 QB): 64mM 。而在 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 菌株培养液中加入 BIT (Qa), 使其终浓度为 0.1mM , 以及 EDTA-2Na (Qb), 使其终浓度为 2mM , 然后混合均匀 (即 96 孔细胞培养板中的混合液中含有 BIT 0.1mM 和 EDTA-2Na 2mM), BIT (Qa) 和 EDTA-2Na (Qb) 就可有效抑制 *P.aeruginosa* ATCC 9027 的生长, 即未见明显生长, 达到复配组合物对菌株生长的最小抑制浓度 (MIC), 利用上面提到的公式: SI (协同指数) = $Q_a/QA+Q_b/QB$, 计算得到的 $SI=0.210$, 即 $SI<1$, 说明 BIT 和 EDTA-2Na 具有协同抑细菌复配增效作用; 同时, 用结晶紫染色法和全波长酶标仪测定菌株在 0.1mM BIT 和 2mM EDTA-2Na 复配组合物胁迫条件下的细菌生物膜形成能力, 测得的 OD_{595} 均值为: 0.134 , 与单独使用 0.1mM BIT 或者 2mM EDTA-2Na 相比, 菌株生物膜形成能力 ($OD_{595}\text{-BIT}=1.207$ 或 $OD_{595}\text{-EDTA-2Na}=0.832$), 分别下降了 88.90% 或 83.89% , 由此可见, 使用本发明所提供的一种协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物培养铜绿假单胞菌 (*P.aeruginosa* ATCC 9027), 除了可以有效抑制该菌浮游菌的生长以外, 也可以有效的抑制其细菌生物膜的形成。

[0023] 实施例5:

[0024] 一种协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物, 用铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) 作为测试菌株, 按照上述测试方法范例中的方法进行测试, 用 96 孔细胞培养板在 30°C 静置培养菌株 24h, 测定的 BIT 对 *P.aeruginosa* ATCC 9027 的 MIC 为 (即 QA): 0.56mM ; 测定的 EDTA-2Na 对 *P.aeruginosa* ATCC 9027 的 MIC 为 (即 QB): 64mM 。而在 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 菌株培养液中加入 BIT (Qa), 使其终浓度为 0.1mM , 以及 EDTA-2Na (Qb), 使其终浓度为 4mM , 然后混合均匀 (即 96 孔细胞培养板中的混合液中含有 BIT 0.1mM 和 EDTA-2Na 4mM), BIT (Qa) 和 EDTA-2Na (Qb) 就可有效抑制 *P.aeruginosa* ATCC 9027 的生长, 即未见明显生长, 达到复配组合物对菌株生长的最小抑制浓度 (MIC), 利用上面提到的公式: SI (协同指数) = $Q_a/QA+Q_b/QB$, 计算得到的 $SI=0.241$, 即 $SI<1$, 说明 BIT 和 EDTA-2Na 具有协同抑细菌复配增效作用; 同时, 用结晶紫染色法和全波长酶标仪测定菌株在 0.1mM BIT 和 4mM EDTA-2Na 复配组合物胁迫条件下的细菌生物膜形成能力, 测得的 OD_{595} 均值为: 0.121 , 与单独使用 0.1mM BIT 或者 4mM EDTA-2Na 相比, 菌株生物膜形成能力 ($OD_{595}\text{-BIT}=1.207$ 或 $OD_{595}\text{-EDTA-2Na}=0.649$), 分别下降了 89.98% 或 81.36% , 由此可见, 使用本发明所提供的一种协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物培养铜绿假单胞菌

(*P.aeruginosa* ATCC 9027),除了可以有效抑制该菌浮游菌的生长以外,也可以有效的抑制其细菌生物膜的形成。

[0025] 实施例6:

[0026] 一种协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物,用铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) 作为测试菌株,按照上述测试方法范例中的方法进行测试,用96孔细胞培养板在30℃静置培养菌株24h,测定的BIT对*P.aeruginosa* ATCC 9027的MIC为(即QA):0.56mM;测定的EDTA-2Na对*P.aeruginosa* ATCC 9027的MIC为(即QB):64mM。而在*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027菌株培养液中加入BIT(Qa),使其终浓度为0.1mM,以及EDTA-2Na(Qb),使其终浓度为8mM,然后混合均匀(即96孔细胞培养板中的混合液中含有BIT 0.1mM和EDTA-2Na 8mM),BIT(Qa)和EDTA-2Na(Qb)就可有效抑制*P.aeruginosa* ATCC 9027的生长,即未见明显生长,达到复配组合物对菌株生长的最小抑制浓度(MIC),利用上面提到的公式:SI(协同指数) $=Qa/QA+Qb/QB$,计算得到的SI=0.304,即SI<1,说明BIT和EDTA-2Na具有协同抑细菌复配增效作用;同时,用结晶紫染色法和全波长酶标仪测定菌株在0.1mM BIT和8mM EDTA-2Na复配组合物胁迫条件下的细菌生物膜形成能力,测得的OD₅₉₅均值为:0.129,与单独使用0.1mM BIT或者8mM EDTA-2Na相比,菌株生物膜形成能力(OD₅₉₅-BIT=1.207或OD₅₉₅-EDTA-2Na=0.801),分别下降了89.31%或83.90%,由此可见,使用本发明所提供的一种协同抑细菌和抗细菌生物膜形成的组合物培养铜绿假单胞菌 (*P.aeruginosa* ATCC 9027),除了可以有效抑制该菌浮游菌的生长以外,也可以有效的抑制其细菌生物膜的形成。