SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(21) Číslo prihlášky: **22-94**

(22) Dátum podania: **09.07.92**

(31) Číslo prioritnej prihlášky: **9115011.0**

(32) Dátum priority: **11.07.91**

(33) Krajina priority: **GB**

(40) Dátum zverejnenia: **07.09.94**

(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: **11.02.99**

(86) Číslo PCT: **PCT/GB92/01248, 09.07.92**

(11) Číslo dokumentu:

279 691

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl [6]

A 01N 63/00
C 12N 1/20 //
(C 12N 1/20,
C 12R 1:01,
C 12R 1:39)

(73) Majiteľ patentu: Agricultural Genetics Co. Limited, Cambridge, GB;

(72) Pôvodca vynálezu: Wilson Michael John, Bristol, GB;
Glen David McKellar, Bristol, GB;
Pearce Jeremy David, West Sussex, GB;

(54) Názov vynálezu: **Použitie nematód Phasmorhabditis na hubenie mäkkýšov, baktérie podporujúce rast nematód, spôsob produkcie týchto nematód a prostriedok obsahujúci nematódy**

(57) Anotácia:
Je opísané použitie nematód rodu Phasmorhabditis na hubenie mäkkýšovitých škodcov v poľnohospodárstve a záhradníctve a škodcov ohrozujúcich zdravie človeka a zvierat. Ďalej sú opísané nové bakteriálne kmene *Moraxella phenylpyruvica* 48, NCIMB 40508 a *Pseudomonas fluorescens* 141, NCIMB 40509, ktoré sa zvlášť hodia na podporu rastu nematód rodu Phasmorhabditis, predovšetkým druhu *P. neopapillosa* a *P. hermaphrodita* a tiež moluskocídny prostriedok obsahujúci nematódy rodu Phasmorhabditis v spojení s baktériami podporujúcimi ich rast, spôsob produkcie týchto nematód a spôsob potláčania mäkkýšov.

Oblasť techniky

Vynález sa týka potláčania poľnohospodárskych a záhradníckych škodcov a predovšetkým hubenia mäkkýšov vrátane slimákov, ako je napríklad slimáčik poľný *(Deroceras reticulatum)* a slimákov, ako je napríklad *Monacha cantiana*. Z dôvodu účelnosti je vynález ďalej opisovaný predovšetkým vo vzťahu k hubeniu slimákov, ale je samozrejmé, že je ho možné využiť tiež pri hubení iných mäkkýšov, ktoré škodia rastlinám na poli a v skleníku alebo ktoré prenášajú parazity, škodlivé pre človeka alebo zvieratá.

Doterajší stav techniky

Slimáky sú rozšírení škodcovia niekoľkých dôležitých poľnohospodárskych plodín, ako je predovšetkým ozimná pšenica, repka olejka a zemiaky. Títo škodcovia spôsobujú veľké škody vo všetkých krajinách sveta, ako sú Veľká Británia a iné európske krajiny, krajiny severnej a strednej Ameriky, ázijské štáty a Austrália. Spôsobujú tiež problémy v záhradníctve záhradkárom. Z ekonomického hľadiska pôsobí najväčšie škody slimáčik poľný *(Deroceras reticulatum,* čeľaď *Limacidae)*, napriek tomu, že i iné slimáky z tejto čeľade ako i slimák *Arion* (čeľaď *Arionidae*), *Tandonia*, *Milax* (čeľaď *Milaqidae*) a *Boettgerilla*, môžu tiež spôsobovať podstatné škody. Tiež ďalšie slimáky sa môžu stať nepríjemnými škodcami v záhradníctve a poľnohospodárstve. Ako jeden príklad slimákov je možné uviesť slimáka *Monacha cantiana* (čeľaď *Helicidae*). Ďalšie príklady škodcov zo skupiny mäkkýšov sú uvedené v publikácii Godan, „Pest Slugs and Snails" 1983, Springer-Verlag, Berlín, Nemecko, Mäkkýše môžu tiež nosiť škodcov, ktorí predstavujú riziko pre zdravie človeka alebo zvierat. Ako príklady je možné uviesť druh *Lymnaea* (čeľaď *Lymnaeidae*), ktorý je nositeľom motolice pečeňovej *((Fasciola hepatica)* a druh *Bulinus* (čeľaď *Bulinidae*), ktorý je nositeľom *Opisthorchis sinensis*. Čeľade *Limacidace, Arionidae, Milacidae a Helicidae* patria do radu *Stylommatophora*. Čeľaď *Bulinidae a Lymnaeidae* patria do radu *Basommatophora*.

Súčasné spôsoby hubenia týchto škodcov sú len sčasti účinné a dostupné chemikálie sú vysoko toxické pre vtáky a cicavce. Z toho dôvodu jasne existuje potreba nájsť účinnejšie, trvalejšie a menej toxické spôsoby potlačovania mäkkýšov.

Podstata vynálezu

Teraz sa s prekvapením zistilo, že *Nematoda* rodu *Phasmarhabditis* predstavujú účinný prostriedok na hubenie širokej palety druhov mäkkýšov. Z druhov, ktoré patria do rodu *Phasmarhabditis* sú obzvlášť účinné príbuzné organizmy *P. neopapillosa a P. hermaphrodita*, ktoré budú podrobnejšie opísané ďalej. Tieto druhy sú známe mnoho rokov a sú opísané v literatúre a charakterizované hlavne v publikácii Andrassy, „A Taxonomic Review of the Sub-Order Rhabditina *(Nematoda: Secernentina)*" (1983, Orstom, Paríž, Francúzsko). Biologická účinnosť týchto organizmov proti škodcom zo skupiny slimákov však dosiaľ známa nebola.

Predmetom vynálezu je teda použitie druhu *Phasmarhabditis* na hubenie poľnohospodárskych a záhradníckych škodcov, poškodzujúcich zdravie človeka a zvierat, predovšetkým škodcov zo skupiny mäkkýšov. Tieto organizmy je možné získať zo slimákov na poli a pestovať ďalej opísanými spôsobmi tak, aby sme ich získali v dostatočnom množstve na spracovanie na vhodné prostriedky, ktoré by bolo možné aplikovať na poli alebo v skleníku. Z typických prostriedkov na praktické použitie sa používajú vhodné nosičové materiály, ako je rašelina, íl a iné pevné alebo polopevné nosiče, ako sú gélovité materiály. Vonkajšie testy vykonávané v malej mierke i v poľnej mierke ukázali, že nematódy môžu usmrcovať slimáky a chrániť semenáčiky čínskej kapusty a osivo alebo semenáčiky pšenice pred poškodením slimákmi prinajmenšom rovnako dobre alebo lepšie, ako to zabezpečuje 3,5-dimetyl-4-metyltiofenylmetylkarbamát, čo je najlepšia chemikália, ktorá je na tento účel v súčasnosti k dispozícii.

Biológia organizmu

Nematódy boli izolované zo slimákov nazbieraných vo výskumnej stanici Long Ashton Research Station vo Veľkej Británii. Bolo zistené, že tieto nematódy spôsobujú smrteľnú chorobu slimákov, ktorá sa prejavuje určitými charakteristickými symptómami, z ktorých je najnápadnejší opuch plášťa slimáka. Bolo zistené, že tieto nematódy patria do podradu *Rhabditina* a na ich ďalšiu identifikáciu bol použitý kľúč (Andrassy, 1983). Dve hlavné taxonomické charakteristiky tejto skupiny sú časť ústna a samčie reprodukčné štruktúry. Nematódy izolované na stanici Long Ashton majú charakteristické krátke ústa (stoma) s izomorfným metastomom a samci, pokiaľ sú prítomní, majú peladeranové bursy, čo sú charakteristické znaky rodu *Phasmarhabditis*. Andrassy (1983) zaznamenal dva druhy, ktoré sú morfologicky totožné s týmito nematódami, ale vzájomne sa od seba líšia počtom samcov, prítomných v týchto populáciách. V druhu *Phasmarhabditis neopapillosa* sú samci a samice rovnako početní, zatiaľ čo v *Phasmarhabditis hermaphrodita* sú samci extrémne vzácni. Doteraz nie je známe, či *P. hermaphrodita* predstavuje zvláštny druh alebo len biologický variant *P. neopapillosa* (Andrassy 1983). *P. hermaphrodita* bol prvýkrát opísaný Maupasom v Archives de Zoologie (1900), zv. 8, m str. 464 až 624, ktorý túto nematódu nazval *Rhabditis caussaneli*. Maupas našiel v črevách slimáka *Arion ater*, ktorého nazbieral v Normandii, rezistentné larválne formy tejto nematódy. Choval kultúry tejto nematódy na zhnitom mäse počas dvoch rokov. Zistil, že dospelé červy sú prevažne protandrické autogamné hermafrodity. Ďalej zistil, že samci sú prítomní len vo veľmi malých počtoch (1 samec na 13 000 samíc) a že počet samcov v kultúrach nie je ovplyvňovaný nutričnými podmienkami. Maupas nikdy nezaznamenal kopuláciu samcov so samicami, z čoho bolo zrejmé, že za prítomnosti samcov nedošlo k žiadnej zmene fekundity nematód ani sexuálneho pomeru v potomstve. Maupas nepovažoval túto nematódu za parazita slimáka.

Phasmarhabditis neopapillosa bol opísaný Mengertom, ktorý nazval túto nematódu *Rhabditis neopapillosa*, v časopise Zeitschrift für Morpholgie und Oekologie Tiere (1953), zv. 41, str. 311 až 349, vo svojej štúdii, týkajúcej sa vzťahu medzi nematódami a zemnými mäkkýšmi. Našiel túto nematódu vo forme rezistentných larválnych štádií, (ktoré označil názvom „dauer larvae") v zadnej časti tráviaceho ústrojenstva slimáka Limax cinereoniger. Mengert považoval nematódu *P. neopapillosa* za saprofyt, ktorý prosperuje na hnijúcom materiáli mnoho generácií, ale keď nastanú nepriaznivé podmienky, mladí jedinci nedospejú a vytvoria rezistentné formy dauer larvae, ktoré neprijímajú potravu. Mengert sa domnieval, že *P. neopapillosa* žije rovnakým spôsobom ako dva iné druhy *Phasmarhabditis papillosa a P. hermaphrodita*. Domnieval sa ďalej, že dauer larvae týchto troch druhov vstúpi, keď nastane príležitosť do tela slimákov, kde zostanú v podobe dauer larvae tak dlho, dokiaľ slimák neuhynie. Až potom pokračujú vo

vývoji a reprodukujú sa, pričom sa živia mŕtvym telom slimáka. Mengert sa domnieval, že pobyt v slimákovi nie je nutnou súčasťou životného cyklu nematódy, ale predpokladal, že dauer larvae týchto druhov skutočne majú určitý stupeň adaptácie na život v slimákovi. Tvrdil však, že tieto nematódy na slimákoch neparazitujú.

Nematódu je možné izolovať zo slimákov zobraných na poli s použitím pascí s návnadou z drvených otrúb, ktoré sa rozmetú na trávnatej ploche. Po rozrezaní slimákov je možné nematódu izolovať z tráviaceho ústrojenstva slimáka alebo dutiny plášťa. V slimákoch žije mnoho druhov nematód (Mengert, 1953) a identifikáciu *P. hermaphrodita a P. neopapillosa* je treba potvrdiť s použitím taxonomického kľúča (Andrassy, 1983). Pokiaľ sa v slimákovi nájdu iba infekčné štádiá nematód (dauer larvae), je potrebné nematódu pestovať, aby ich bolo možné identifikovať.

Nematódy *Phasmarhabditis* boli izolované vo výskumnej stanici Long Ashton pri mnohých príležitostiach. V niektorých prípadoch sa populácia nematód skladala zo samcov a samíc, zatiaľ čo v iných prípadoch sa populácie skladali len z hermafroditov. Nematódy z populácií oboch typov boli vyšetrované svetelnou mikroskopiou a elektrónovou mikroskopiu (SEM). Tiež boli zisťované proteínové profily v rôznych populáciách po separácii proteínov izoelektrickou fokuzáciou. Neboli zistené žiadne rozdiely medzi populáciami s použitím ktorejkoľvek z uvedených metód. Izolované nematódy zodpovedajú dostupnému opisu *P. neopapillosa a P. hermaphrodita.*

Nematódu *Phasmarhabditis* je možné pestovať spôsobmi, ktoré sú uvedené v tomto opise. V tomto odbore je už známe, že nematódy, ktoré parazitujú na hmyze je možné pestovať vo veľkej mierke na obchodné využitie v kvapalných kultúrach s použitím miešaných nádrží alebo tzv. „airlift" podnosoch s kúskami peny. Podobné techniky sa môžu používať pri produkcii *P. hermaphrodita* alebo *P. neopapillosa* vo veľkej mierke. Nematódy, ktoré sa používajú podľa tohto vynálezu, je teda možné ľahko pestovať na ľadvinovom médiu vo forme kúskov peny alebo vo forme kvapalnej kultúry, s použitím podobných techník, aké sa používajú pri produkcii nematód, ktoré parazitujú na hmyze. Na účely tohto vynálezu sa odporúča, aby bola kultúra nematód zbieraná v stave dauer larvae.

Požiadavky na pripojené baktérie

Nematódy *Phasmarhabditis* sa živia baktériami. Po izolácii z uhynutých slimákov bolo zistené, že nematódy *Phasmarhabditis* sú spojené s mnohými bakteriálnymi izolátmi. V súvislosti s vynálezom bol študovaný vzťah medzi týmito nematódami a pripojenými baktériami, aby sa zistilo, ktoré baktérie sú schopné podporovať dobrý rast nematód a na porovnanie patogenity nematód chovaných na rôznych druhoch baktérií.

S cieľom konzistentnej produkcie vo veľkej mierke nematód *Phasmarhabditis*, ktoré sú patogenické proti slimákom, sa nematódy prednostne pestujú v kultúrach s jednou známou pripojenou baktériou (monoxénické kultúry) a z toho dôvodu je potrebné vyvinúť spôsob selekcie jednotlivých druhov baktérií, ktoré sú schopné podporovať rast nematód. Baktérie, ktoré sú schopné podporovať rast nematód, môžu byť izolované z nematód, z kultúry nematód, rastúcich na zmesovej mikrobiálnej populácii, zo slimákov infikovaných baktériami z mŕtvych tiel slimákov, zamorených nematódami. Nematódy je možné zbaviť všetkých kontaminujúcich baktérií a previesť do kultúr s odlišným jediným druhom baktérie. Inkubácia týchto kultúr s odlišným jediným druhom baktérie. Inkubácia týchto kultúr umožňuje selekciu bakteriálnych izolátov, ktoré sú schopné podporovať rast nematód.

Z nematód, slimákov infikovaných nematódami a mŕtvych slimákov zamorených nematódami bolo získaných približne 100 bakteriálnych izolátov, z ktorých 15 bolo skúšaných na schopnosť podporovať rast nematód. Bolo zistené, že z týchto 15 izolátov, celkove 9 izolátov, ktoré predstavujú 8 druhov, podporuje dobrý rast na agare. 8 druhov baktérií, o ktorých sa zistilo, že podporujú dobrý rast nematód je uvedených ďalej:

Pseudomonas fluorescens
Providencia rettgeri
Serratia proteomaculans
Aeromonas salmonicida
Moraxella phenylpyruvica
Bacillus cereus
Flavobacterium odoratum
Flavobacterium brevi

Schopnosť nematód pestovaných na rôznych druhoch baktérií usmrcovať slimáky, je možné zistiť biologickým pokusom. Pri takomto biologickom pokuse sú slimáky exponované rôznemu počtu nematód a zaznamenáva sa výsledná mortalita slimákov. Pomocou tejto metódy je možné kvantitatívne vyhodnotiť patogenitu (napríklad hodnotu LD_{50}) nematód proti slimákom a použiť túto hodnotu na porovnanie patogenity nematód pestovaných na rôznych druhoch baktérií. Je dôležité, aby boli nematódy dodávané v spojení so špecifickými baktériami, pretože baktérie sú dôležité nielen pre rast nematód (tak in vitro, ako in vivo), ale tiež pre ich schopnosť usmrcovať slimáky. Nematódy si nesú pripojené baktérie pri vstupe do slimáka, čo umožňuje rýchle zabývanie sa a rýchlu reprodukciu nematód, ktorá vedie k smrti slimáka.

Ako príklady vhodných bakteriálnych kmeňov je možné uviesť *Moraxella phenylpyruvica* kmeň 48 a *Pseudomonas fluorescens* kmeň 141, vzorky ktorých boli uložené v súlade s Budapeštianskou dohodou v národnej zbierke priemyslových a morských baktérií (National Collection of Industrial an Marine Bacteria, 23 St. Machar Drive, Aberdeen, AB2 IRY, Veľká Británia) pod prírastkovými číslami NCIMB 40508 a NCIMB 40509 dňa 9. júna 1992. Kmeň *Pseudomonas fluorescens* 141 je gram negatívny, oxidáza pozitívna, kataláza pozitívna baktéria, ktorá je nemotilná a má negatívny výsledok pri skúške O/F (Hugh and Leifson) pri aeróbnom alebo anaeróbnom štiepení glukózy. Kmeň *Moraxella phenylpyruvica* 48 je gram negatívna, oxidáza pozitívna, kataláza pozitívna baktéria, ktorá je nemotilná a má negatívny výsledok pri skúške O/F (Hugh and Laifson). Biochemické profily oboch týchto kmeňov na štandardných substrátoch (skúšobný prúžok API ZONE) sú uvedené ďalej.

Reakcia	Moraxella phenylpyruvica 48	Pseudomonas fluorescens 141
NO_3-NO_2	+	-
NO_3-N_2	*	-
indol	-	-
kyselina z glukózy	-	-
arginín dihydroláza	-	+
ureáza	-	-
hydrolýza eskulínu	-	-
hydrolýza želatíny	-	+
β-galaktozidáza	-	-
Asimilácia		
glukózy	-	+
arabinózy	-	+
maniózy	-	+
N-acetylgluko-	-	+

zamínu		
maltózy	-	-
glukonátu	-	+
kaprátu	-	+
adipátu	-	-
malátu	-	+
citrátu	+	+
fenylacetátu	-	-

* = neskúšané

Užitočné varianty kmeňa *M. phenylpyruvica* 48 a kmeňa *P. fluorescens* 141 je možné získať opakovaným prenášaním čistých kultúr týchto kmeňov do subkultúr. Varianty je možné tiež získať reizoláciou baktérií z nematód *Phasmorhabditis*, ktoré boli predtým pestované v spojení s ktorýmkoľvek z týchto kmeňov alebo reizoláciou baktérií zo slimákov, infikovaných nematódami. Takéto varianty môžu mať zakotvené genotypické alebo fenotypické zmeny v dôsledku vplyvu okolia alebo selektívneho tlaku. Užitočné deriváty kmeňa *M. phenylpyruvica* 48 a kmeňa *P. fluorescens* 141 je možné skonštruovať zavedením DNA z iného organizmu, ktorá kóduje požadované atribúty. Spôsoby zavádzania cudzej DNA do baktérií sú odborníkom v tomto odbore dobre známe a zahŕňajú také techniky, ako je prenos plazmidu, transdukcia a transfekcia. Užitočné mutanty kmeňa *M. phenylpyruvica* 48 a kmeňa *P. fluorescens* 141 je možné získať mutagenézou s použitím metód, ktoré sú odborníkom v tomto odbore dobre známe, ako sú chemické techniky (napríklad s použitím nitrosuguanidínu), fyzikálne techniky (napríklad s použitím ultrafialového svetla) a genetické metódy (napríklad mutagenéza transpozónu). Takéto varianty, deriváty a mutanty týchto kmeňov je možné meniť, pokiaľ sa týka takých vlastností, ako je rýchlosť rastu alebo schopnosť rásť na určitých zdrojoch potravy, ale zachovávajú si hlavne vlastnosti, ktoré sú dôležité pre tento vynález, t. j. schopnosť podporovať rast nematód *Phasmarhabditis* a indukovať týmto nematódam patogenicitu proti mäkkýšom.

Na použitie na ničenie poľnohospodárskych škodcov sa nematódy zbierajú z fermentorov odstreďovaním, filtráciou alebo odstránením zložiek vyčerpaného média a buď sa priamo spracujú na pesticídny prostriedok alebo sa skladajú vo forme chladených prevzdušňovaných vodných suspenzií pred tým, ako sa spracujú na tento prostriedok. Na poľnohospodárske použitie je možné nematódy spracovať na vodné suspenzie na tuhých nosičoch, ako je aktívne uhlie, íl, rašelina, vermikulit alebo polyéter-polyuretánová huba alebo je možné ich zapuzdriť do gélov, napríklad do alginátového alebo polyakrylamidového gélu. Mimoriadne vhodným prostriedkom je prostriedok, obsahujúci vysušené alebo sčasti vysušené nematódy. Nematódový prostriedok sa môže aplikovať pri ničení škodcov vo forme vodnej suspenzie, ktorá sa z neho vyrobí a ktorá sa aplikuje na ošetrovanú plochu napríklad postrekom, zavodnením alebo morením.

Vynález je bližšie objasnený v nasledujúcich príkladoch realizácie. Tieto príklady majú výhradne ilustratívny charakter a rozsah vynálezu v žiadnom ohľade neobmedzujú.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Spôsob izolácie nematód *Phasmarhabditis*

Živé nematódy získané zo slimákov pozbieraných na poli použitím pascí s drvenými otrubami ako návnadou, sa umiestni na ľadvinové agarové médium, vyrobené zmiešaním 10 % homogenizovaných bravčových ľadvín, 3,5 % kukuričného oleja, 2 % agaru a 84,5 % vody (% hmotnosti), ktoré bolo sterilizované v autokláve a naliate do Petriho misiek. Toto médium povzbudzuje rast baktérií spojených s nematódami. Nematóda sa týmito baktériami živia a na miskách rastú a reprodukujú sa.

Príklad 2

Izolácia baktérií spojených s nematódami alebo so slimákmi infikovanými nematódami

Baktérie spojené s nematódami alebo so slimákmi infikovanými nematódami sa môžu izolovať ktorýmkoľvek z nasledujúcich spôsobov:

i Izolácia baktérií z nematód

Nematódy sa povrchovo sterilizujú ponorením do roztoku etylmerkuritiosalicylátu sodného (Thimerosal) s koncentráciou 1 g/l na 1 hodinu a potom sa prenesú do čerstvého roztoku Thimerosalu na ďalšie 3 hodiny. Baktérie je možné uvoľniť z nematód nasledujúcimi 2 sterilnými mikrobiologickými technikami:

a) Jednotlivé larvy nematód sa prenesú do kvapky sterilného roztoku chloridu sodného, ktorá je umiestnená na mikroskopickom sklíčku, ktoré bolo sterilizované plameňom. Nematódy sa potom rozrežú na niekoľkých miestach po dĺžke svojho tela. Kvapka roztoku kuchynskej soli obsahujúca mŕtve telá nematód sa potom pomocou sterilnej Pasteurovej pipety prenesie do Petriho misky so živnou agarovou pôdou s priemerom 9 cm a rozprestrie sa na povrchu pomocou stierky, ktorá bola sterilizovaná v plameni alkoholového horáku.

b) Veľké množstvo povrchovo sterilizovaných nematód sa suspenduje v 1 ml sterilného Ringerovho roztoku a vzniknutá suspenzia sa prenesie do 5 ml homogenizátora tkanív z teflónu. Suspenzia nematód sa rozdrví a potom sa prenesie do 9 ml sterilnej živnej pôdy. Živná pôda sa intenzívne pretrepáva a urobí sa sériové riadenia. 0,1 ml alikvotnej vzorky každej zriedenej pôdy sa umiestni na misku so živým agarom, rozprestrie sa po povrchu pomocou sklenej stierky a inkubuje sa. Po 49 hodinách inkubácie pri 25 °C je možné na základe morfológie kolónií vybrať rôzne bakteriálne izoláty a preniesť ich do subkultúr štandardnými mikrobiologickými postupmi.

ii Izolácia baktérií z xénických kultúr s kúskami peny

Z prosperujúcich xénických kultúr sa pomocou chemických klieští, ktoré boli sterilizované v plameni alkoholového horáka odoberú kúsky peny, obsahujúcej nematódy a baktérie. Každý kúsok sa umiestni do skúmavky obsahujúcej 10 ml sterilnej živnej pôdy a obsah skúmavky sa premieša. Urobí sa sériové riedenie vzniknutej suspenzie baktérií a nematód a 0,1 ml alikvotnej vzorky rôzne zriedenej pôdy sa rozprestrie na miske so živným agarom, potom sa inkubuje.

iii Izolácia baktérií zo živých slimákov infikovaných metódami

P. hermaphrodita/p. neopapillosa infikuje plášťovú oblasť slimáka, kde dochádza tiež k jeho reprodukcii. Práve z tejto oblasti je možné izolovať baktérie. Plášť sa najprv utrie suchým chumáčikom vaty, aby sa v čo najväčšej miere odstránil sliz. Potom sa povrch plášťa utrie 70 % (objemovo) etanolom, z dôvodu povrchovej sterilizácie plášťa. V plameni sterilizovanou ihlou sa prepichne plášť a potom sa kvapky tekutiny na konci ihly priamo prenesú na misky so živným agarom, kde sa rozprestrú pomocou sklenenej stierky a inkubujú.

iv Izolácia baktérií z mŕtvych slimákov

Tkanivové stery z mŕtveho tela slimáka, ktorý uhynul po infekcii nematódami a je nematódami pokrytý, sa suspendujú v živnej pôde s použitím bakteriologického očka. Urobí sa sériové riadenie vzniknutej suspenzie a 0,1 ml a-

likvotnej vzorky sa rozprestrie na miskách so živným agarom a inkubuje sa.

Príklad 3

Spôsob selekcie baktérií, ktoré podporujú rast nematód

Predtým, ako je možné urobiť screening rôznych baktérií, čo sa týka ich schopnosti podporovať rast nematód, je najprv nutné získať nematódy, ktoré by boli bez baktérií. Samičí reprodukčný trakt nematód je obvykle sterilný (Poinar a Hnsen, Helminthological Abstracts, Serie B, (1986) zv. 55, č. 3, str. 61 až 81), a preto sú juvenily (Jl) ihneď po vyliahnutí sterilné. Jednotlivé gravidné dospelé nematódy, vybraté z kultúr nematód alebo slimákov sa prenesú na sterilné hodinové sklíčko obsahujúce roztok Thimerosalu koncentrácie 0,2 g/l, kde sa ponechajú cez noc pri 10 °C. V priebehu tohto času sa z vajíčok dospelých vyliahnu a uvoľnia juvenily (Jl). Nasledujúci deň sa juvenily prenesú pipetou do centrifugačných skúmaviek naplnených 10 ml Ringerovho roztoku so štvrtinovou silou, ktorý obsahuje 500 U/ml penicilínu G a streptomycínusulfátu. Juvenílie sa v tomto roztoku ponechajú ďalších 24 hodín pri 10 °C. Potom sa skoncentrujú jemným odstredením (50 x g, počas 10 minút), zoberú sa z dna skúmavky a resuspendujú v čerstvom sterilnom Ringerovom roztoku so štvrtinovou koncentráciou a znovu sa odstredia. Resuspendovanie a centrifugácia sa ešte jedenkrát opakuje, aby sa odstránili všetky stopy antibiotika. Potom sa larvy umiestnia na sterilné hodinové sklíčko. Potom je možné s nematódami manipulovať jednotlivo pomocou mikropipety, ktorá je zhotovená natiahnutím kvapkacej pipety v Bunsenovom horáku, až do šírky približne 0,1 mm. Nematódové kultúry sa pestujú na ľadvinovom agare (opísanom v príklade 1) v Petriho miskách s priemerom 3 cm. Dávka jedného bakteriologického očka 18 hodín starej kultúry živnej pôdy so skúšanými baktériami sa nanesie čiarovito cez polovicu 30 mm misiek s ľadvinovým agarom. Na kraj Petriho misky v tej jej polovici, ktorá neobsahuje baktérie sa umiestni 10 xénických juvenilných nematód, získaných spôsobom opísaným v príklade 8 tak, aby nematódy museli prekonať aspoň 15 mm vzdialenosť cez povrch bez baktérií predtým, ako sa dostanú ku skúšanej baktérii. Misky sa inkubujú pri 15 °C. Akákoľvek baktéria, ktorá je prítomná na nematódach a ktorá nebola usmrtená v priebehu axenizačného procesu, vytvára viditeľné kolónie v tejto polovici misky a takéto misky je možné potom vyradiť. Po 1 týždni sa misky majúce bakteriálnu kontamináciu v „čistej" polovici zlikvidujú. Po 2 týždňoch sa môže spočítať počet nematód prítomných na miske priamym mikroskopickým pozorovaním; viečko Petriho misky sa odstráni a nahradí iným viečkom, na ktorom bola vopred vyznačená počítacia mriežka. Po 3 týždňoch je možné nematódy spočítať znova tak, že sa nematódy spláchnu z agaru do známeho objemu vody a nematódy sa vo výslednej suspenzii spočítajú v Petrovej jednomilimetrovej počítacej komôrke.

Deväť rôznych druhov baktérií, ktoré boli izolované opísanými spôsobmi, sa podrobia skúšaniu na schopnosť podporovať rast nematód. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Počet nematód *Phasmarhabditis* v Petriho miske po 2 a 3 týždňoch rastu v monoxénickej kultúre s rôznymi baktériami. Na štatistickú analýzu sú údaje prevedené na logaritmy

Baktérie	Po 2 týždňoch		Po 3 týždňoch	
	Počet	Log	Počet	Log
Axenické	2	0,41	0	0,00
Baktérie A1	170	2,18	18090	4,22
Baktérie 17	0	0,04	0	0,00
Baktérie 34	1	0,13	890	1,00
Baktérie 48	60	1,70	54060	4,73
Baktérie 54	80	1,53	25950	4,39
Baktérie 77	1160	3,06	86340	4,93
Baktérie 83	520	2,46	67000	4,78
Baktérie 141	690	2,77	75220	4,85
Baktérie 156	250	2,26	83630	4,89

Smerodajná odchýlka na porovnávanie logaritmov počtu nematód je 0,204, 128 D. F.

Po 3 týždňoch vznikli vysoko signifikantné ($P < 0,001$) rozdiely v schopnosti baktérií podporovať rast nematód.

Príklad 4

Spôsob masovej kultivácie nematód Phasmarhabditis v kultúre s kúskami peny

Nematódy je možné masovo pestovať na kúskoch polyéter-polyuretánovej peny s použitím podobných techník, aké boli vyvinuté na masovú produkciu nematód parazitujúcich ha hmyze (Bedding, v Nematologica (191), zv. 27, str. 109 až 114 a Annals od Applied Biology (1984), zv. 104, str. 117 až 120). Toto médium sa skladá zo 65 % bravčovej ľadvinky, 15 % hovädzieho vypečeného tuku a 25 % vody (% hmotnostné). Ľadvina sa rozseká na malé kúsky, pridá sa voda a zmes sa rozdrví v miešači Waring. Hovädzí vypečený tuk sa roztaví v širokej panvici nad kruhovým plynovým horákom, potom sa k nemu pridá ľadvinový homogenát, ktorý sa dôkladne zmieša s tukom a vorí tak dlho, dokiaľ nezhnedne. Zmes sa potom vráti do miešača Waring, kde sa znova rozomelie. Vzniknutá zmes sa potom zmieša s kúskami peny, pričom k jednému hmotnostnému dielu kúska peny sa pridá 12 dielov hmotnostných média. Vzniknuté médium sa môže uložiť do kónických baniek alebo autoklávovacích vriec, opísaných Beddingom (1984). Kultúry s kúskami peny sa súčasne zaočkujú tak nematódami, ako i baktériami. V každom vreci sa v hornej časti prereže štrbina a pridá sa 75 ml cez noc narastenej baktérie. Kultúra baktérií môže byť v podobe zmesovej mikrobiálnej kultúry, získanej spôsobom opísaným v príklad 2, alebo vo forme čistej kultúry bakteriálneho kmeňa, vybraného na základe schopnosti podporovať rast nematód, ako je to opísané v príklade 3. Pridajú sa nematódy na agare z Petriho misiek alebo na kúskoch peny z predchádzajúcich vrecových kultúr. Vrecové kultúry sa inkubujú pri 15 °C počas 3 týždňov. Po tomto čase je možné vnútri vriec vidieť mnoho infekčných juvenilov, ktoré vo vreciach zanechajú upotrebené médium. Nematódy sa zbierajú z kúskov peny modifikovaným postupom extrakcie v nálevke, ktorý sa podobá postupu používanému na izoláciu nematód zo zemných vzoriek. Medené sito na zeminu s priemerom 17,5 cm filtrom na mlieko a umiestni sa na 50 cm misku pod kvetináč. Kúsky peny z vriec sa umiestnia v sitách do hĺbky približne 2 cm a potom sa kvetináčové misky naplnia vodou tak, že sa vodná hladina práve dotýka spodnej vrstvy kúskov peny. Sitá sa potom v tomto stave uchovávajú cez noc. V priebehu tohto času živé nematódy preplávajú filtrom na mlieko a zhromaždia sa vo vode pod filtrom. Suspenzia nematód sa prečistí od vypotrebovaného média a baktérií niekoľkonásobnou výmenou vody a potom sa nematódy skladajú v prevzdušňovanej vode pri 10 °C až do času použitia.

Príklad 5

Kvapalná kultúra monoxenických nematód *Phasmarhabditis*

Axenizované nematódy sa pestujú na pevnom médiu s obsahom ľadviny s príslušnými baktériami. Po troch týždňoch sa nematódy prenesú do kvapalnej kultúry.

Nematódy sa pestujú v kultúre umiestnenej v trepacej fľaši pri nasledujúcich podmienkach:
Médium: 10 % ľadvín, 1 % kvasinkového extraktu, 3,5 % kukuričného oleja
Nádoba: 250 ml kónická banka s 50 ml média
Teplota: 15 °C
Frekvencia otáčania trepačky: 200 min^{-1}.

Nádoby sa zaočkujú 1 ml druhu baktérie pestovaného v živnej pôde. Po 24 hodinách sa nematódy spláchnu do baniek pomocou sterilnej vodovodnej vody a nasleduje trojtýždenná inkubácia.

Nematódy sa 2 x opláchnu sterilnou vodou a spočítajú. Potom sa tieto nematódy použijú ako inokulum pre experimentálne kultúry. Nematódy sa pridajú do baniek vopred inokulovaných baktériami v množstve 3000 nematód na 1 ml obsahu banky.

Nematódy sa pestujú v spojení so 4 rôznymi druhmi baktérií. V priebehu kultivácie sa v rôznom čase zisťujú počty nematód. Dauer larvae (štádium, ktoré je rovnako známe pod označením infekčné juvenílie), sa považujú za nematódy so zachovaným druhým stupňom cuticula.

Nematódy sa spočítajú po 20 dňoch inkubácie a zistené výsledky sú uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 2
Kvapalná kultúra monoxénických nematód

Baktérie	Počet replikácií	Stredný počet nematód v 1 ml Dauer Larvae	Iné štádiá
P. fluorescens	6	1220	110
S. proteomaculans	6	11400	7400
P. rettgeri	6	99900	189000
M. phenylpyruvica	3	72000	223000

Odborníci v tomto odbore môžu na základe podmienok opísaných v tomto príklade ľahko vyriešiť masovú produkciu nematód v kvapalnej kultúre vo veľkopriestorových fermentoroch.

Príklad 6
Spôsob selekcie baktérií udeľujúcim patogenitu proti slimákom

Nematódy pestované v monoxénickej kultúre s 2 druhmi baktérií, *Providencia rettgeri a Moraxella phenylpyruvica* (pozri príklad 5) sa skúšajú na patogenitu proti slimáčikovi poľnému *Deroceras reticulatum*. Škatuľa z plastu (rozmery 135 x 75 x 50 mm) sa naplní 440 g na vzduchu sušených zemných agregátov s priemerom 12,5 až 25 mm, ktoré boli získané spracovaním na sitách. Zemné agregáty z každej škatule sa vyberú a namočia 80 ml vody.

Používajú sa jednak neošetrené škatule, do ktorých sa nepridajú nematódy a škatule, do ktorých sa pridajú nematódy v 5 rôznych dávkach 15000, 23000, 35000, 55000 a 75000 nematód na škatuľu z plastu. Pre všetkých 6 pokusov s oboma várkami monoxénických nematód sa použijú vždy 2 škatule (dvojnásobná replikácia).

Nematódy sa spočítajú a ich príslušný počet sa suspenduje v 50 ml vodovodnej vody. Agregáty sa znovu umiestnia do škatule a suspenzia nematód sa rovnomerne rozdelí na povrch agregátov, vrstva po vrstve. Medzi prostredné vrstvy v každej škatuli sa umiestni 10 jedincov *D. reticulatum*. Na agregátoch v každej škatuli sa rovnomerne rozdelí 50 ml vodovodnej vody bez toho, aby sa pridávali ďalšie nematódy tak, aby výsledný obsah vlhkosti v každej škatuli bol približne 30 % hmotnostných.

Slimáky sa pestujú v pôde v priebehu infekčnej periódy v dĺžke 5 dní pri 10 °C a potom sa vyberú a prenesú do Petriho misiek, kde sa pestujú jednotlivo a kŕmia kotúčikmi, odobratými z listov čínskej kapusty. Po ďalších 9 dňoch pri 10 °C (po 14 dňoch od začiatočnej expozície nematódam) sa zaznamenaný počet mŕtvych a živých slimákov. Údaje mortality sa opravia vzhľadom na mortalitu pozadia, ktorá je zrejmá z neošetrených škatúľ. Opravené údaje mortality sa vynesú do grafu, ako závislosť od dávky nematód, t. j. nematód, pestovaných v monoxénickej kultúre s oboma baktériami.

Pri tomto experimente sú nematódy pestované c *M. phenylpyruvica a Pr. rettgeri* patogénne proti *D. reticulatum*. Túto metódu je možné použiť na selekciu iných kmeňov baktérií, napríklad kmeňa *U. fluorescenc* 141, ktorý udeľuje patogenitu proti slimákom.

Príklad 7
Spracovanie nematód *Phasmarhabditis* na pesticídny prostriedok

Monoxénické nematódy *Phasmarhabditis*, ktoré boli pestované v spojení s kmeňom 48 *M. phenylpyruvica* (pozri príklad 5) sa zoberú odstredením a premytím vodou pri použití opakovaného cyklu usadzovania a resuspendácie v čerstvej vode, ktorý sa robí tak dlho, pokiaľ sa nematódy nezbavia reziduálneho rastového média. Premyté nematódy sa skoncentrujú odstreďovaním na vodnú pastu tvorenú nematódami, v ktorej je obsiahnuté 0,1 x 10^6 až 2,0 x 10^6 nematód v jednom grame. Nematódová pasta sa zmieša s ílom na báze montomorillonitu vápenatého, so vznikom vo vode dispergovateľnej práškovitej zmesi, obsahujúcej 0,05 x 10^6 až 1,8 x 10^6 nematód v jednom grame (hmotnosť za vlhka).

Príklad 8
Schopnosť nematód *Phasmarhabditis*, produkovaných v kultúre z kúskov peny, usmrcovať rôzne druhy slimákov

Nematódy *Phasmarhabditis*, ktoré boli pestované na zmesovej bakteriálnej flóre spôsobmi opísanými v príklade 4 boli skúšané v biologickom pokuse proti šiestim škodlivým druhom slimákov. Týmito druhmi sú *Derocereas recitulatum, D. caruanae, Arion ater, A. intermedius, A. distinctus a Tandonia (Milax) sowerbyi*. Slimáky boli nazbierané do pascí s návnadou z rozomletých otrúb vo výskumnej stanici Long Ashton Research Station v novembri 1990. Všetky slimáky boli dospelé, s výnimkou *A. ater*, čo boli juvenilné formy (stredná hmotnosť 770 mg). Nematódy boli pestované v xénických vrecových kultúrach s kúskami peny spôsobom opísaným v príklade 4. Do plastových škatúľ s rozmermi 135 x 75 x 50 mm bolo umiestnených 440 g na vzduchu sušených zemných hrubozrnných agregátov s priemerom 12,5 až 25 mm, ktoré boli získané spracovaním na sitách. Do každej zo škatúľ ošetrovaných nematódami, bolo pridaných približne 1,9 x 10^5 infekčných lariev *Phasmarhabditis*, suspendovaných v 130 ml vodovodnej vody. Do neošetrených škatúľ bolo pridaných 130 ml vodovodnej vody bez nematód. Do každej zo škatúľ bolo vložených 10 slimákov, s výnimkou väčších druhov *T. sowerbyi a A. ater*, ktorých bolo pridaných vždy 5. 17 slimákov *A. distinctus* bolo ošetrených nematódami a 18 slimákov bolo chovaných bez ošetrenia ako kontrolné zvieratá. U všetkých ostatných druhov bolo vždy 20 slimákov ošetrených a 20 slimákov bolo ponechaných bez ošetrenia ako kontrolné zvieratá. Slimáky boli ponechané v pôde na päťdennú infekčnú periódu, po ktorej boli škatule so zeminou rozobraté a bol zaznamenaný počet mŕtvych slimákov. Slimáky, ktoré prežili, boli prenesené do 9 cm Petriho misiek obložených zvnútra filtračným papierom, kde boli uchovávané jednotlivo a kŕmené listovými kotúčikmi čínskej kapusty. Škatule so zeminou a Petriho misky boli po celý čas trvania biologického pokusu uchovávané pri 10 °C. Po-

čet mŕtvych slimákov bol zaznamenaný ešte 2 x v trojdenných intervaloch. Mortalita jednotlivých druhov slimákov v ošetrených a neošetrených škatuliach v každom momente, keď bolo robené zaznamenávanie, bola porovnávaná pomocou chí^2 testu. Výsledky sú uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3
Percentuálna mortalita rôznych druhov slimákov po 5, 8 a 11 dňoch od ošetrenia nematódami alebo bez ošetrenia

Druh slimáka	Po 5 dňoch		Po 8 dňoch		Po 11 dňoch	
	ošetrený	neošetrený	ošetrený	neošetrený	ošetrený	neošetrený
Deroceras reticulatum	100	10	100	25	100	40
Deroceras caruanae	70	10	100	15	100	20
Aion ater	5	0	40	0	100	0
Arion intermedius	100	40	10	60	100	70
Arion distinctus	6	6	88	11	100	28
Tandonia sowerbyi	20	15	80	15	100	25

Po päťdennej infekčnej perióde boli rozdiely v mortalite medzi slimákmi ošetrenými nematódami a neošetrenými slimákmi vysoko signifikantné ($P < 0,001$), v prípade *D. reticulatum, D. caruanae a A. intermedius*. Rozdiely v mortalite medzi ošetrenými a neošetrenými slimákmi pri ostatných troch druhoch neboli v tomto štádiu signifikantné. Po ôsmich dňoch boli rozdiely v mortalite medzi ošetrenými a neošetrenými slimákmi signifikantné pri všetkých druhoch ($P < 0,001$) pre *D. reticulatum, D. caruanae, T. soweberyi a A. distinctus* a $P < 0,01$ pre *A. ater a A. intermedius*. Do jedenásteho dňa všetky slimáky, na ktorých boli aplikované nematódy, uhynuli. Rozdiely v mortalite medzi ošetrenými a neošetrenými slimákmi boli signifikantné pre všetky druhy ($P < 0,01$) pre *A. intermedius* a $P < 0,01$, pre všetky ostatné druhy). Rozdiel v prípade *A. intermedius* nebol taký veľký, pretože mnoho neošetrených slimákov uhynulo.

Z týchto výsledkov je zrejmé, že nematódy *Phasmarhabditis* sú schopné usmrcovať všetky skúšané druhy slimákov.

Príklad 9
Schopnosť nematód *Phasmarhabditis* pestovaných v kultúrach s kúskami peny znižovať poškodenie rastlín, spôsobené slimáčikom poľným *Deroceras reticulatum* za poľných podmienok
Bol urobený pokus na minipolíčkach, ktorého účelom bolo porovnať poškodenie semenáčikov čínskej kapusty slimákmi na neošetrených políčkach, políčkach ošetrených peletami methiocarbu (táto látka je považovaná za najlepšiu dostupnú chemikáliu potláčajúcu slimáky) a políčkach ošetrených jedinou vysokou dávkou nematód, produkovaných v kultúre s kúskami peny, na zmesovej bakteriálnej flóre, spôsobom opísaným v príklade 3. Pri pokuse sa používa séria 40 mikropolíčok obsahujúcich hlinitú zem na podloží z hrubého štrku. Rozmery políčok boli 70 x 70 a ich hĺbka bola 30 cm. Políčka boli od seba oddelené drevenými alebo betónovými obrubníkmi, na ktorých bol upevnený 10 cm vysoký plot z medeného drôteného pletiva s priemerom 0,8 mm, ktorý predstavoval zábranu pre pohyb slimáka medzi jednotlivými políčkami.

V rozmedzí marec až jún 1989 bolo 36 týchto políčok osídlených slimákmi. Do zostávajúcich štyroch políčok neboli pridané žiadne slimáky a tieto políčka slúžili ako mierka rezidentnej slimačej populácie. Do každého z osídlených políčok bolo vložených 5 na poli zobraných dospelých *D. reticulatum*. Tieto slimáky boli držané aspoň dva týždne v karanténnych škatuliach, aby sa zaručilo, že nenesú žiadne parazity. Na každé políčko bolo v priebehu trojmesačnej periódy vložených 34 v laboratóriu chovaných novovyliahnutých jedincov *D. reticulatum*, takže na začiatku pokusu boli na políčkach prítomné slimáky v mnohých štádiách vývoja.

Experiment bol koncipovaný tak, že sa robilo 9 replikácií 4 randomizovaných blokov, pričom každý blok zahŕňal 2 neošetrené políčka, 1 políčko ošetrené nematódami a 1 políčko ošetrené peletami methiocarbu.

V 900 ml vodovodnej vody bolo suspendovaných $1,05 \times 10^6$ nematód a vzniknutá suspenzia bola použitá na zálievku políčok pomocou kropiacej kanvičky. Ďalších 100 ml vodovodnej vody bolo použité na vypláchnutie kanvičky a i táto voda bola naliata na políčka. Na neošetrené políčka a na políčka ošetrené methiocarbom bol tiež naliaty 1 l vodovodnej vody. Pelety methiocarbu boli pridané v odporučenej dávke na poľné ošetrenie (5,5 kg/ha 0,275 g /políčko). Pelety boli navážené a ručne rovnomerne rozdelené po políčkach. V priebehu celého pokusu boli políčka zavlažované zvrchu pomocou zavlažovacieho potrubia tak, aby sa zaistili priaznivé podmienky na aktivitu slimákov.

Na začiatku pokusu bolo na každé políčko vysadených 9 semenáčikov (štvorec 3 x 3) čínskej kapusty, pestovaných v skleníku. Rastliny boli kontrolované 2 x týždenne a odhadom (s presnosťou 5 %) bolo zisťované poškodenie rastlín slimákmi.

Dva týždne po vysadení boli semenáčiky na niektorých neošetrených políčkach úplne zničené, takže zvyšky starých semenáčikov boli zo všetkých týchto políčok odstránené a boli vysadené nové. To sa opakovalo po ďalších 2 týždňoch. Po ďalších 2 týždňoch bol pokus ukončený (celkový čas trvania pokusu bol 6 týždňov). Poškodenie semenáčikov v priebehu pokusu bolo zaznamenávané 2 x týždenne. Plôtiky z medeného drôteného pletiva medzi políčkami sa v jednom z blokov (blok č. 9) uvoľnili po prvých 4 týždňoch, čo umožnilo slimákom pohyb medzi týmito políčkami. Tieto políčka boli preto ignorované a zaznamenané výsledky po 5 a 6 týždňoch sa vzťahujú len na 8 blokov.

Na konci každého pokusu boli z každého políčka zo zostávajúcich 8 blokov odobraté 2 vzorky zeminy (25 x 25 x 10 cm), pričom 1 vzorka bolo odobratá z prostriedku a 1 z juhovýchodného rohu každého políčka. Vzorky boli postupne zavodňované počas 9 dní v extrakčnej jednotke pre slimáky LARS (Glen & Wiltshire, Proceedings 1986 British Crop Protection conference (1986), zv. 1, str. 139 až 144), a z povrchu boli každý deň odstraňované slimáky.

Rozsah poškodenia semenáčikov slimákmi pri každom ošetrení v priebehu pokusu je zrejmý z obr. 1.

Analýza variancie po uhlovej transformácii, s cieľom stabilizácie variancie ukazuje, že tak pelety methiocarbu, ako i nematódy signifikantne ($P < 0,01$) znížili rozsah škody spôsobené semenáčikom. Pri prvom odčítaní (4 týždne po ošetrení) bola zistená signifikantne ($P < 0,05$) rozsiahlejšia škoda na políčkach ošetrených nematódami, v porovnaní s políčkami ošetrenými methiocarbom, ale keď semenáčiky rastom prekonali začiatočné poškodenie, rozdiel medzi políčkami ošetrenými nematódami a políčkami ošetrenými methiocarbom sa znížil. Koncom prvého týždňa mali políčka ošetrené nematódami menšie poškodenie ako políčka ošetrené methiocarbom, ale tento rozdiel nebol signifikantný. Po 17 dňoch (prvé vyšetrenie druhej dávky semenáčikov) mali políčka ošetrené nematódami signifikantne ($P < 0,05$) nižšie poškodenie, v porovnaní s políčkami ošet-

renými methiocarbom a tento stav ($P < 0,01$) zostal zachovaný až do konca pokusu.

V zemných vzorkách boli nájdené 3 druhy slimákov, *Deroceras reticulatum, Deroceras caruanee a Boetgerilla pallens*. Na všetkých políčkach boli nájdené len 2 slimáky *D. caruanae*, ale 39 slimákov *B. pallens*, v porovnaní s 55 slimákmi *D. reticulatum*. Slimáky *B. pallens* boli na políčka pravdepodobne zavlečené niekedy predtým a medzi tým sa reprodukovali a políčka osídlili. Strava, ktorej tieto slimáky dávajú prednosť, nie je známa, ale pri laboratórnych skúškach nepoškodzovali listy čínskej kapusty v priebehu trojtýždennej expozície, pri ktorej im nebol ponúknutý žiadny alternatívny zdroj potravy. Je teda nepravdepodobné, že by tieto slimáky spôsobili poškodenie semenáčikov pri opisovanom pokuse.

V zemných vzorkách zo 4 políčok, na ktoré neboli pridané žiadne slimáky *D. reticulatum*, neboli ani žiadne tieto slimáky nájdené. To naznačuje, že na rozdiel od *B. pallens* neboli pred začiatkom pokusu na políčkach žiadne slimáky *D. reticulatum* alebo ich tam bolo iba málo.

Celkové počty slimákov a hodnoty biomasy extrahovanej zo vzoriek s rôznym ošetrením boli prevedené na druhú odmocninu z dôvodu štatistickej analýzy. Tieto výsledky sú zrejmé z obr. 2.

Signifikantne menej slimákov bolo extrahovaných z políčok ošetrených nematódami ako z neošetrených políčok ($P < 0,01$) pre všetky druhy slimákov a pre samotný druh *D. reticulatum*) a tiež bolo extrahovaných menej slimákov z políčok ošetrených methiocarbom ako z neošetrených políčok (P 0,05 pre všetky druhy slimákov a pre samotný druh *D. reticulatum*). I napriek tomu, že bolo extrahovaných menej slimákov z políčok ošetrených nematódami ako z políčok ošetrených methiocarbom, tento rozdiel nebol signifikantný. Z políčok ošetrených metódami nebol extrahovaný žiadny slimák *D. reticulatum*, čo ukazuje, že tento druh bol na políčkach takmer vyhubený. Počty slimákov *B. pallens* neboli podstatne ovplyvnené nematódami, ani methiocarbom, napriek tomu, že na políčkach ošetrených nematódami bolo zistených menej slimákov B. *pallens* ako na políčkach, ktoré ošetrené neboli.

Príklad 10

Schopnosť monoxénických nematód *Phasmarhabditis* usmrcovať rôzne druhy škodcov zo skupiny mäkkýšov

Monoxénické nematódy *Phasmarhabditis*, ktoré boli pestované v spojení s kmeňom 48 *M. phenylpyruvica* spôsobom opísaným v príklade 5, boli použité pri biologickom pokuse proti rôznym druhom škodcov zo skupiny mäkkýšov vrátane *Monacha cantiana*, spôsobom opísaným v príklade 8. Výsledky sú uvedené v tabuľke 4.

Tabuľka 4

Percentuálna mortalita rôznych druhov škodlivých mäkkýšov po ošetrení monoxénickými nematódami alebo bez ošetrenia

Druh mäkkýša	Trvanie biologického pokusu (dni)	Po ošetrení	Bez ošetrenia
Deroceras reticulatum	11	100	15
Deroceras caruanae	11	100	10
Monacha cantiana	5	100	0
Arion intermedius	5	100	0
Arion distinctus	11	100	0
Tandonia sowerbyi	11	70	5

Rozdiely v mortalite medzi ošetrenými a neošetrenými mäkkýšmi boli signifikantné ($P < 0,001$) pri všetkých skúšaných druhoch, čo ukazuje, že všetky skúšané druhy škodcov zo skupiny mäkkýšov boli susceptibilné proti nematódam *Phasmarhabditis sp.*, monoxenizovaným pomocou kmeňa 48 *M. phenylpyruvica*. Spektrum aktivity monoxénických nematód nebolo zmenené v porovnaní s xénickými nematódami.

Monoxénické nematódy *Phasmarhabditis* boli pestované v spojení s *M. phenylpyruvica* alebo *P. rettgery* spôsobom opísaným v príklade 5 a boli použité v rôznej dávke pri biologickom pokuse proti slimákom druhu *D. reticulatum* spôsobom, opísaným v príklad 8. Výsledky sú zhrnuté na obr. 3. Oba typy monoxénických nematód boli účinné proti *D. reticulatum*.

Príklad 11

Schopnosť monoxénických nematód *Phasmarhabditis* potlačovať poškodenie rastlín spôsobené slimáčikom poľným *Deroceras reticulatum* za poľných podmienok

Bol urobený poľný pokus s cieľom porovnať škody na ozimnej pšenici (odroda *Mercia*) spôsobenej slimákmi, na neošetrených políčkach, na políčkach ošetrených peletami methiocarbu a políčkach ošetrených rôznymi dávkami nematód. Monoxénické nematódy boli vypestované v spojení s kmeňom 48 *M. phenylpyruvica*, spôsobom opísaným v príklade 5 a spôsobom opísaným v príklade 7 spracované s použitím ílu na vo vode dispergovateľný prášok, obsahujúci $0,36 \times 10^6$ nematód v grame výsledného prostriedku (vlhká hmotnosť). Nematódy boli aplikované ihneď po osiatí políčok vo forme vodného postreku s objemom ekvivalentným 1100 l/ha. Methiocarbové pelety boli aplikované ručne v odporúčanej poľnej dávke 5,5 kg/ha.

Na monitorovanie slimačej populácie na pokusných políčkach boli použité povrchové pasce a zemné vzorky. Na políčkach bolo nájdených mnoho rôznych druhov slimákov vrátane *Deroceras reticulatum, Arion silvaticus, Arion subfuscus, Arion ater, Tandonia soweberyi a Milax gagates, ale D. reticulatum* jasne prevažoval.

Šesť týždňov po siatí boli políčka skontrolované na vzídené semenáčiky. Táto kontrola predstavuje odhad letálneho poškodenia slimákmi, (t. j. zníženie počtu vzídených rastlín). Zároveň bol urobený odhad sub-letálneho poškodenia slimákmi, (t. j. ožeru rastlín slimákmi), na základe vizuálneho odhadu na náhodne zvolených rastlinách. Stredný počet vzídených pšeničných rastlín, vztiahnutý na 0,5 m dĺžky brázdy pri rôznych ošetreniach je uvedený v tabuľke 5.

Tabuľka 5

Stredný počet vzídených rastlín pšenice, vztiahnutý na dĺžku brázdy pri rôznom ošetrení pri poľnom pokuse (hodnotenie robené 6 týždňov po siatí)

Ošetrenie		Stredný počet vzídených rastlín
bez ošetrenia		12,93
dávka nematód	1×10^8/ha	12,78
dávka nematód	3×10^8/ha	13,95
dávka nematód	1×10^9/ha	13,25
dávka nematód	3×10^9/ha	14,88
dávka nematód	1×10^{10}/ha	16,50
methiocarb		14,57

smerodajná odchýlka = 1,314 (399 d. f.)

So zvyšujúcou sa dávkou nematód jasne stúpa počet vzídených rastlín, čo je dôkaz, že ošetrenie nematódami znížilo letálne poškodenie slimákmi.

Údaje vzťahujúce sa k strednej percentuálnej ploche listu, poškodenej slimákmi, bola pred analýzou prevedená na uhly. Výsledky sú uvedené v tabuľke 6.

Tabuľka 6
Stredná uhlová percentuálna plocha listov poškodená slimákmi, vztiahnutá na rastlinu pri rôznych ošetreniach pri poľnom pokuse (hodnotenie sa robí 6 týždňov po siatí)

Ošetrenie	Stredná uhlová percentuálna plocha listov poškodená na jednej rastline
bez ošetrenia	31,82
dávka nematód 1 x 10^8/ha	29,15
dávka nematód 3 x 10^8/ha	28,87
dávka nematód 1 x 10^9/ha	22,11
dávka nematód 3 x 10^9/ha	18,63
dávka nematód 1 x 10^{10}/ha	16,49
methiocarb	25,17

smerodajná odchýlka = 3,395, (24. f.)

Boli zistené podstatné rozdiely v ploche listu poškodenej slimákmi medzi jednotlivými ošetreniami ($P < 0,001$), pričom rastliny ošetrené troma najvyššími dávkami nematód vykazovali signifikantne ($P < 0,01$) nižšie poškodenie slimákmi ako rastliny z neošetrených políčok. Rastliny z políčok ošetrených najvyššou dávkou nematód mali podstatne ($P < 0,05$) nižšie poškodenie slimákmi, v porovnaní s rastlinami z políčok ošetrených methiocarbom. Je teda zrejmé, že nematódy sú schopné poskytnúť dobrú úroveň potlačenia sub-letálnych škôd spôsobených slimákmi.

Príklad 12
Schopnosť monoxénických nematód Phasmarhabditis usmrcovať vodné slimáky Lymnaea stagnalis

Monoxénické nematódy boli napestované v spojení s kmeňom 48 M. phenylpyruvica, spôsobom opísaným v príklade 5 a spôsobom opísaným v príklade 7, spracované s použitím ílu na vo vode dispergovateľný prášok, obsahujúci 0,36 x 10^6 nematód v grame výsledného prostriedku (vlhká hmotnosť). 10 exemplárov vodného slimáka Lymnaea stagnalis bolo pridané do každej z piatich čistých nádrží na ryby, ktoré boli z polovice naplnené rybničnou vodou, obsahujúcou niektoré vodné rastliny ako zdroj potravy pre slimáky. Nádrže boli prevdzušňované malým vzduchovým čerpadlom a udržované pri teplote 15 °C.

Do každej zo štyroch nádrží bolo pridaných približne 6 x 10^6 nematód vo forme vo vode dispergovateľného prostriedku. Do piatej nádrže, ktorá slúžila ako kontrolná, neboli pridané žiadne nematódy. Po 3 dňoch inkubácie bola priemerná hodnota mortality slimákov v nádržiach ošetrených nematódami 45 % a po 6 dňoch vzrástla na 100 %. Po 6 dňoch inkubácie nebola zaznamenaná žiadna mortalita v neošetrenej kontrolnej nádrži.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie nematód rodu *Phasmarhabditis* na hubenie poľnohospodárskych a záhradníckych škodcov a škodcov ohrozujúcich zdravie človeka a zvierat.

2. Použitie podľa nároku 1, kde nematódy sú zvolené zo súboru zahŕňajúceho druhy *P. neopapillosa* a *P. hermaphrodita*.

3. Použitie podľa nároku 1 alebo 2 v spojení s vhodnou baktériou podporujúcou rast.

4. Použitie podľa nároku 1 alebo 2 v spojení s vhodným spoločenstvom baktérií podporujúcich rast.

5. Použitie podľa nároku 1, 2, 3 alebo 4 na hubenie škodcov zo skupiny mäkkýšov v poľnohospodárstve a záhradníctve.

6. Použitie podľa nároku 5 na hubenie škodlivých slimákov z čeľade *Limacidae*, predovšetkým *Deroceras reticulatum* a *Deroceras caruanae*.

7. Použitie podľa nároku 5 na hubenie škodlivých slimákov z čeľade *Arionidae*, predovšetkým *Arion ater*, *Arion intermedius* a *Arion distinctus*.

8. Použitie podľa nároku 5 na hubenie škodlivých slimákov z čeľade *Milacidae*, predovšetkým *Tandonia sowerbyi*.

9. Použitie podľa nároku 5 na hubenie škodlivých slimákov z čeľade *Helicidae*, predovšetkým *Monacha cantiana*.

10. Použitie podľa nároku 1, 2, 3 alebo 4 na potláčanie mäkkýšovitých škodcov ohrozujúcich zdravie človeka a zvierat.

11. Použitie podľa nároku 10 na hubenie slimačích škodcov rodu *Lymnea*.

12. Použitie podľa ktoréhokoľvek z prechádzajúcich nárokov, pri ktorom sa nematódy aplikujú v podobe dauer larvae.

13. Použitie podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, pri ktorom sa nematódy aplikujú v spojení s baktériami podporujúcimi rast týchto nematód.

14. Kmeň *Moraxella phenylpyruvica* 48, ktorého vzorka bola uložená pod prírastkovým číslom NCIMB 40508, alebo jeho variant, derivát alebo mutant, majúci schopnosť podporovať rast a indukovať patogenitu nematód *Phasmarhabditis* voči mäkkýšom.

15. Kmeň *Pseudomonas fluorescens* 141, ktorého vzorka bola uložená pod prírastkovým číslom NCIMB 40509, alebo jeho variant, derivát alebo mutant, majúci schopnosť podporovať rast a indukovať patogenitu nematód *Phasmarhabditis* voči mäkkýšom.

16. Prostriedok na hubenie škodcov zo skupiny mäkkýšov v poľnohospodárstve a záhradníctve a mäkkýšovitých škodcov ohrozujúcich zdravie človeka a zvierat, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje druh nematódy rodu *Phasmarhabditis*, v spojení s vhodnou baktériou alebo bakteriálnou komunitou, podporujúcou rast týchto nematód a vhodný nosič alebo zapuzdrovacie činidlo.

17. Prostriedok podľa nároku 16, **vyznačujúci sa tým**, že nematódy sú v ňom prítomné vo forme dauer larvae.

18. Prostriedok podľa nároku 15, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje druh nematód *P. neopapillosa* alebo *P. hermaphrodita*.

19. Prostriedok podľa nároku 16, **vyznačujúci sa tým**, že baktérie podporujúce rast sú zvolené zo súboru zahŕňajúceho druhy:
Pseudomonas fluorescens
Providencia rettgeri
Serratia proteomaculans
Aeromonas salmonicida
Moraxella phenylpyruvica
Bacillus cereus
Flavobacterium odoratum
Flavobacterium brevi.

20. Prostriedok poľa nároku 19, **vyznačujúci sa tým**, že ako baktériu podporujúcu rast obsahuje kmeň *Moraxella phenylpyruvica* NCIMB 40508 alebo *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 40509.

21. Prostriedok podľa nároku 16, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m ,** že ako nosič obsahuje íl.

22. Vo vode dispergovateľný práškovitý prostriedok podľa niektorého z nárokov 16 až 21, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m ,** že obsahuje íl tvorený montomorillonitom vápenatým, vodu a nematódy, pričom koncentrácia nematód je v rozmedzí od 0,1 x 10^6 do 2,0 x 10^6, prednostne od 0,3 x 10^6 do 0,8 x 10^5 na gram vlhkej hmotnosti.

23. Spôsob produkcie nematód na hubenie mäkkýšov, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m ,** že sa nematódy rodu Phasmarhabditis pestujú v kvapalnom médiu, pričom rastové médium sa preinokuluje aspoň jednou baktériou podporujúcou ich rast a indukujúcou patogenitu nematód a potom sa nematódy zbierajú vo forme dauer larvae.

24. Spôsob podľa nároku 23, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m ,** že sa baktérie podporujúce rast volia zo súboru zahŕňajúceho druhy.

Pseudomonas fluorescens
Providencia rettgeri
Serratia proteomaculans
Aeromonas salmononicida
Moraxella phenylpyruvica
Bacillus cereus
Flavobacterium odoratum
Flavobacterium brevi.

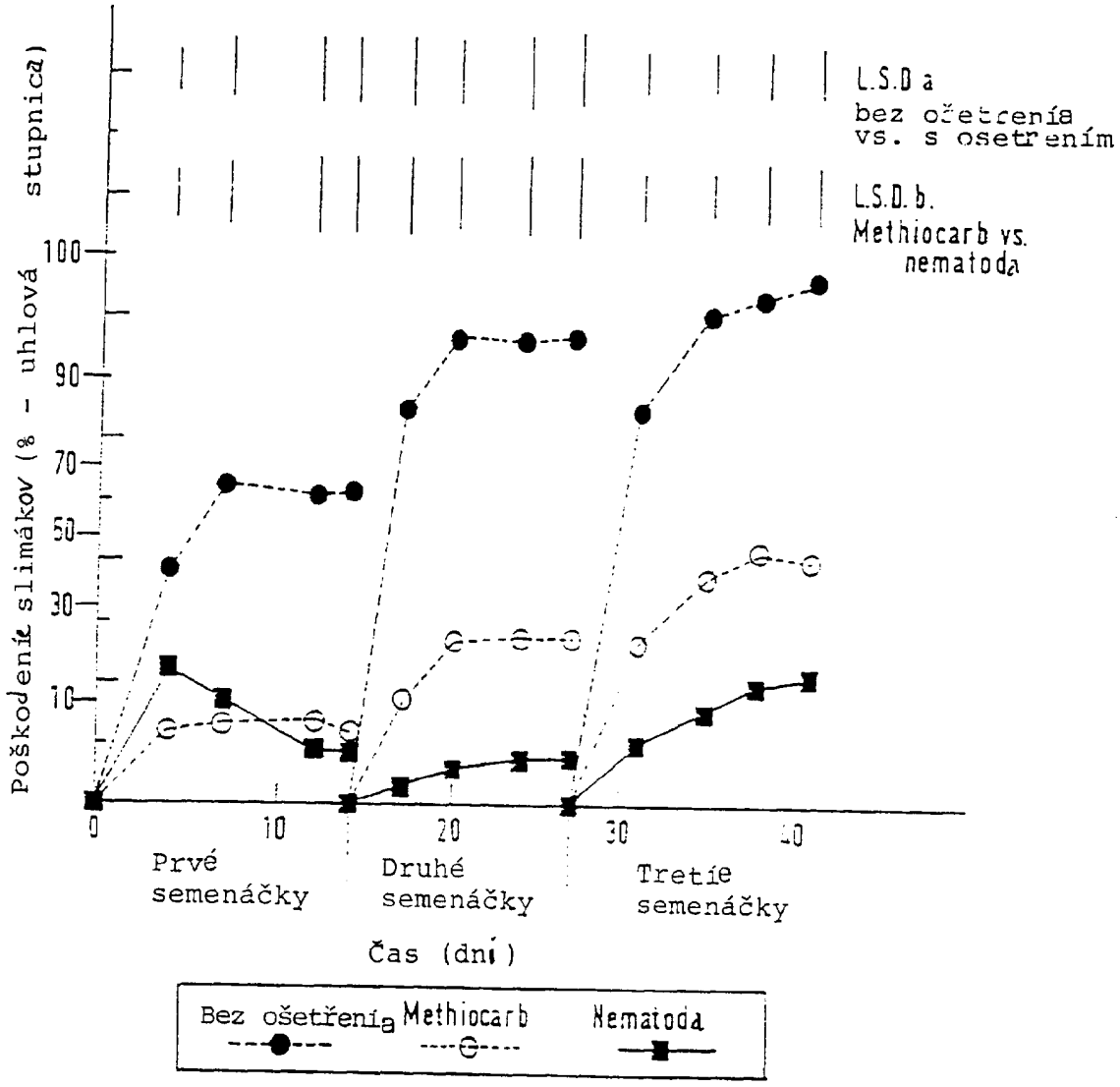
25. Spôsob podľa nároku 24, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m ,** že baktériou podporujúcou rast je *buď Moraxella phenylpyruvica* alebo *Pseudomonas fluorescens.*

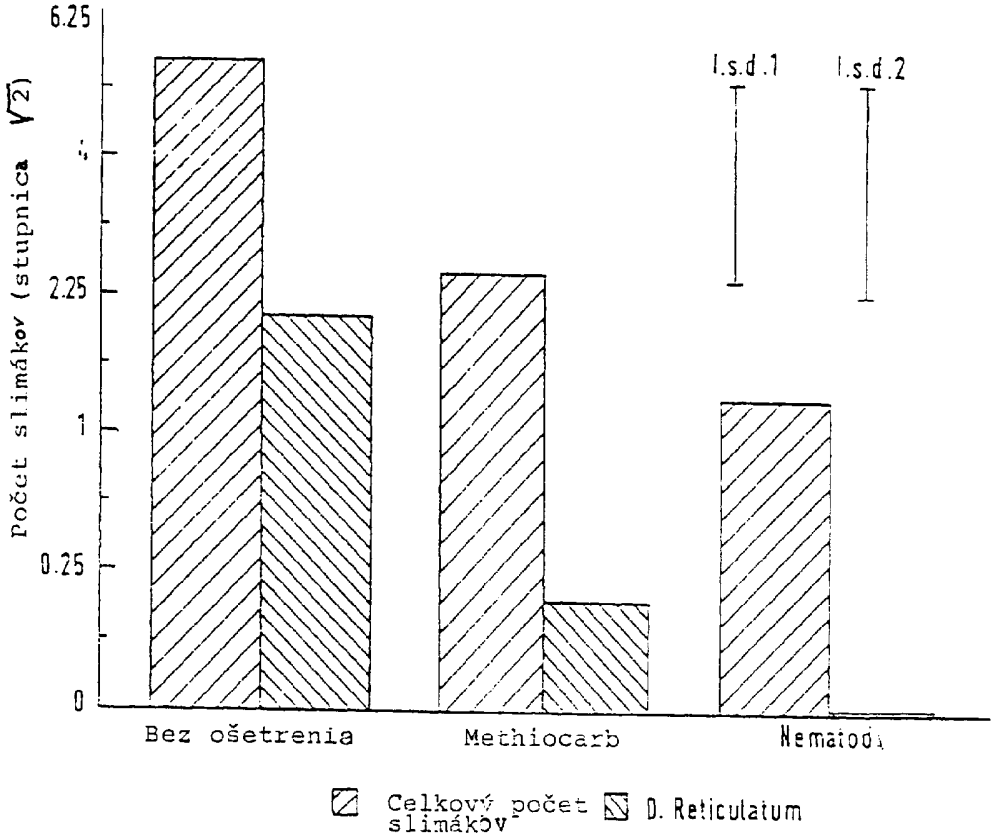
26. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 23 až 25, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m ,** že rastové médium obsahuje zdroj vitamínov a minerálov, zdroj triglyceridov a zdroj proteínu.

27. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 23 až 26, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m ,** že rastové médium obsahuje ľadvinu, kvasinkový extrakt a kukuričný olej.

28. Spôsob hubenia mäkkýšov, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m ,** že sa na plochu, ktorá je mäkkýšmi zamorená, aplikujú moluscocidné nematódy rodu *Phasmarhabditis,* v spojení s baktériami podporujúcimi ich rast.

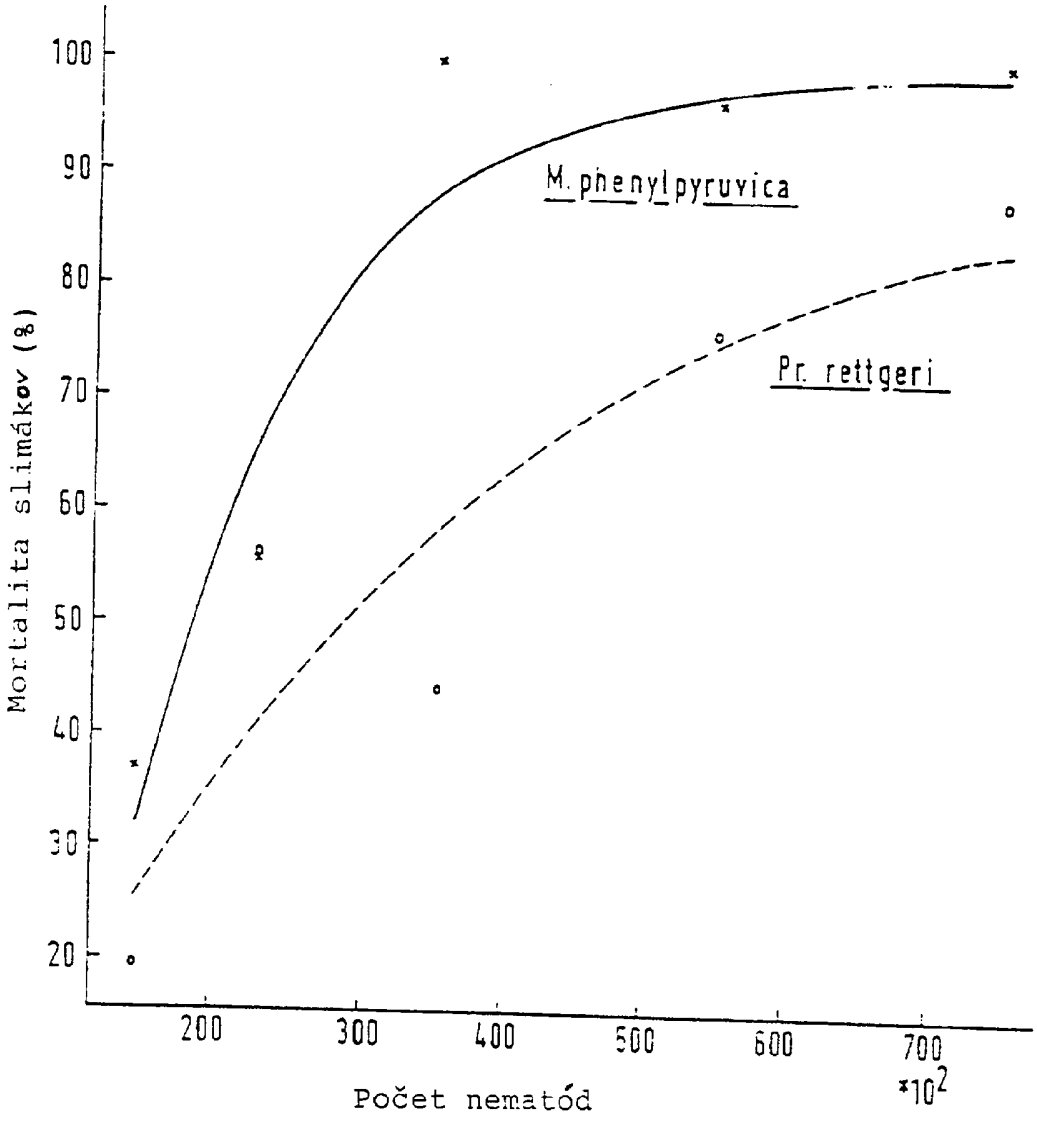
3 výkresy


L.S.D a
bez ošetrenía
vs. s osetrením
L.S.D. b.
Methiocarb vs.
nematoda
Poškodenie slimákov (% - uhlová stupnica)
100
90
70
50
30
10
0
10
20
30
40
Prvé
semenáčky
Druhé
semenáčky
Tretie
semenáčky
Čas (dní)
Bez ošetrenia
Methiocarb
Nematoda



l.s.d.1 (pre porovnanie celkového počtu slimákov(P=0,05 22 d.f.)

l.s.d.2 (pre porovnanie počtu D. reticulatum (P=0,05 22 d.f.)



Koniec dokumentu