



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU 235 786

## K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita  
(22) Přihlášeno 28 09 82  
(21) PV 6920-82

(11) (B1)

(51) Int. Cl.<sup>3</sup> A 01 N 63/02

(40) Zveřejněno 17 09 84  
(45) Vydáno 01 12 86

(75)

Autor vynálezu

WEISER JAROSLAV RNDr. DrSc.,  
VANKOVÁ JIŘINA RNDr.Csc.,  
ČERNÝ MIROSLAV dr.ing., PRAHA,  
BASTL VLADIMÍR ing.,  
LAKOTA VLADIMÍR ing.Csc., SLUŠOVICE

(54) Způsob výroby insekticidního bakteriálního preparátu proti housenkám škůdců z krystaloforních bacilů druhu *Bacillus thuringiensis*

Způsob výroby insekticidního bakteriálního preparátu proti housenkám z krystaloforních bacilů ze skupiny *Bacillus thuringiensis* submersní metodou za stálého míchání a vzdušnění při teplotě 29 - 32 °C zaočkováním do sterilní tekuté půdy obsahující asimilovatelné sacharidy a asimilovatelný organický zdroj dusíku, vyznačený tím, že asimilovatelných sacharidů a asimilovatelného zdroje dusíku s obsahem růstových faktorů a vitamínů se použije v poměru 2 až 3 : 1 při výchozím pH do 7,5, přičemž po ukončení fermentace se účinná složka z fermentační půdy izoluje a po přidání smáčedla, adhesivního prostředku a ochranné látky se suší.

Předmětný vynález se vztahuje na výrobu nového bakteriálního preparátu jako selektivního biologického prostředku pro hubení hmyzích škůdců-housenek z řádu Lepidopter.

Je známo, že dosud používané chemické insekticidní prostředky jako je např. DDT, HCH, vedou k vyvolání resistance hmyzu proti nim. V případech, kdy se tyto insekticidy dostanou do potravy člověka, vyvolávají v organismech lidí nežádoucí reakce a irreversibilní poruchy.

Ukázalo se, že neomezené používání insekticidů vedle přímého potřísnění potravin způsobuje znečištění rostlin, s kterými se dostávají do mléka, masa, tuků zvířat, takže znečištění potravy insekticidem je daleko častější, než by se zdálo. Chemické insekticidy zasahují rovněž nepříznivě do biocenot luk a lesů tím, že spolu se škůdcem hubí i nespočet drobných druhů hmyzu vesměs užitečných jako paraziti škůdců a porušují tak rovnováhu v přírodě.

Uvedené nevýhody vedly k hledání šetrnějších cest k potírání škůdců, jakým je biologický boj, který využívá přirozených nepřátel hmyzu specializovaných na určitého škůdce. Jsou to nemoci a cizopasníci hmyzu. Pro umělé namnožení infekce na umělých půdách se hodí hlavně entomopatogenní bacily ze skupiny *Bacillus thuringiensis*, které vytvářejí krystaly toxické pro housenky. Jejich velmi virulentním reprezentantem je *Bacillus thuringiensis*, na jehož příkladu je dále vynález popsán. *Bacillus thuringiensis* je bakterie, která způsobuje selektivně hynutí housenek Lepidopter, nepoškozuje jiný užitečný hmyz a není toxická pro člověka a jiné teplokrevné organismy, ptáky, ryby, ani pro rostliny.

Již v r. 1962 byl vypracován patent 105416 na způsob výroby insekticidního bakteriálního preparátu z *Bac. thuringiensis*, který však byl nyní pozměněn v kultivačním režimu; <sup>byla</sup> vypracována progresivní nová forma finalizace a preparát založen na později izolovaných nových kmenech se zvýšeným účinkem hlavně na velké housenky a housenky můr.

Způsob podle vynálezu umožňuje provozní výrobu standardního bakteriálního preparátu z bacilů druhu *Bacillus thuringiensis* ekonomickým způsobem ve velkém měřítku za použití moderního zařízení v krátkém čase.

Vynález se týká způsobu výroby insekticidního bakteriálního preparátu z krystaloforních bacilů druhu *Bacillus thuringiensis* submersní metodou za stálého míchání a vzdušnění při teplotě 29 až 32°C zaočkováním do sterilní tekuté půdy obsahující asimilovatelné sacharidy a asimilovatelný organický zdroj dusíku, vyznačený tím, že asimilovatelných sacharidů a asimilovatelného zdroje dusíku se použije v poměru 2 až 3 : 1 s obsahem růstových faktorů a vitaminů při výchozím pH do 7,5, přičemž ukončení fermentace je podmíněno uvolněním insekticidní složky, která se dále z fermentační tekutiny izoluje a po přidání smáčedla, adhesivního prostředku a ochranné látky suší.

Bacil se kultivuje aerobně v submersních podmínkách ve sterilní tekuté půdě za stálého vzdušnění a míchání. Kultivační doba je 48 hod až 72 hod., optimální teplota okolo 30°C, výchozí pH se může pohybovat mezi 6,5 a 7,5, nejlépe 7,0 až 7,2. Během fermentace se pH udržuje v téměř rozmezí pomocí přísady např.  $K_2HPO_4$  nebo  $CaCO_3$  nebo  $NaHCO_3$ . Může být použito různých medií obsahujících asimilovatelný uhlík a dusík. Zdrojem uhlíku mohou být asimilovatelné sacharidy (mono-, di- nebo polysacharidy, např. glukosa, sacharosa, škrob). Asimilovatelným zdrojem dusíku je bílkovinný materiál, nejlépe obsahující současně vitaminy a růstové faktory, např. kvasničný autolysát, kvasničný extrakt, sušené kvasnice, pepton, sojová mouka, kukuřičná mouka, pšeničná mouka, mouka z odtučněných bavlníkových klíčků, kaseinový hydrolyzá, kukuřičný extrakt, výpalky po výrobě alkoholických nápojů, rybí moučka apod.).

Je vhodné přidat do kultivačního média oligobiogenní prvky jako Mg, Mn, Fe, Zn, Ca-soli.

Po skončení vývoje a 90-95 % vysporulování kultury bacilu, kdy se současně uvolní insekticidní krystaly, se účinná biomasa spor a krystalů z fermentační tekutiny izoluje a suší. Před izolací se vmíchá do fermentační tekutiny s biomasou ochranná látka např. laktosa nebo NaCl (5 až 20 %), smáčedlo (5 až 10 %) např. Triton X, Tween 20, Chevron, Slovasol a adhesivní prostředek (množství do 5 %) např. melasa, kasein, latex, syrup. Izolace sporového materiálu se provede odstředěním nebo filtrací. Fermentační tekutinu s biomasou je možno zahustit na filmové odparce nebo odstředivkou typu Lavall. Sušení je možno provést několika způsoby: proudem teplého vzduchu, lyophilisací, ve vakuové sušárně nebo ve sprayové sušičce nebo precipitací acetonem s následujícím vysušením. Materiál spor a krystalů ve směsi suchého prášku si zachovává svoje insekticidní vlastnosti po řadu let, je-li uskladněn v suchu a chladu.

Uvedený výrobní způsob insekticidního preparátu platí i pro ostatní krystaloforní bacily ze skupiny *Bacillus thuringiensis*, jako jsou např. variety *thuringiensis*, *alesti*, *kurstaki*, *sotto*, *dendrolimus*, *kenyae*, *galleriae*, *subtoxicus*, *entomocidus*, *morrisoni*, *nigeriae*, *telworthi*, *darmstadtensis*, *toumanoffi*, *moritai* a další.

Biologickým testem na housenkách *Lepidopter* (např. housenkách zavíječe moučného, zavíječe datlového, zavíječe paprikového, běláška zelného apod.), a srovnáním se standardem se určí biologická aktivita preparátu v biologických jednotkách. Biologický test trvá 7 až 10 dní.

#### Příklad 1.

Živná půda na třepačce, v předočkovacím tanku a fermentačním tanku má složení: 1,5 % sojové mouky, 1,4 % kukuřičného škrobu, 0,03 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,002 %  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,002 %  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,002 %  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 %  $\text{NaHCO}_3$ . 500 ml baňky na třepačku se zaočkují 20 až 24 hod. Kulturou kmene *Bac. thuringiensis* vyrostlého na šikmém agaru o složení: škrob 2 %, pepton 0,75 %, kvasničný autolyzát 2,5 %,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,68 %, stopové prvky 0,1 % základního roztoku (základní roztok:

$K_2SO_4$  17,4 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  12,3 g,  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,22 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  2,0 g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  1,44 g,  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  18,3 g,  $H_2O$  1000 ml). Baňky na třepačku se plní 50 ml půdy a zaočkuje se kulturou z 1 šikmého agaru vždy 3 baňky. Předočkovací tank se očkuje 1 až 3 % 24-hod. kultury z třepačky. Fermentační tank se zaočkuje 20- až 24-hod. kulturou z předočkovacího tanku (2 až 10 %). Kultivace ve fermentačním tanku probíhá při 28 až 32°C za vzdušnění 1/2 objemem vzduchu a míchání 300 otáček/min. 70 - 72 hod., až dojde k uvolnění spor a krystalů v 95 % kultury.

Po skončení fermentace se do fermentační tekutiny s biomasou *Bacillus thuringiensis* vmíchá laktosa (10 až 20 % počítáno na sušinu), smáčedlo Slovasol (5 až 10 %) a 1 % melasy, míchá se 30 min. a suší se na sprayové sušičce (vstup 150 - 200°C, výstup maximálně 80°C).

Biotestem na housenkách zavíječe *Ephestia cautella* se stanoví aktivita preparátu v Mezinárodních biologických jednotkách.

#### Příklad 2.

Živná půda skládající se z 2,5 % glukosy, 3 % kukuřičného extraktu a 0,68 %  $K_2HPO_4$  o pH 7,0 - 7,2 se v předočkovacím tanku zaočkuje 1 až 3 % vegetativního inokula bacilu 24 hodin starého, vyrostlého na třepacím stroji na živné půdě obsahující 2 % škrobu, 0,75 % peptonu, 2,5 % kvasničného autolysátu, 0,68 %  $K_2HPO_4$  a 0,1 % oligobiogenních (stopových) prvků (viz příklad 1) a kultivuje se při 29 - 30°C za vzdušnění 1/2 objemem vzduchu a míchání 200 otáček/min. 20 až 24 hod. Takto připraveným inokulem z předočkovacího tanku se zaočkuje fermentační tank. Kultivace ve fermentačním tanku probíhá při 30°C za vzdušnění 1/2 objemem a míchání 300 ot/min 54 až 72 hod., až dojde k uvolnění spor a inkluzí v 95 % kultury. K biomase spor a inkluzí se přidá 10 - 20 % laktosy a smáčedlo Tween 20 5 - 10 %, zahustí se na filmové odparce a suší na sprayové sušičce jako v příkladě 1. V získaném preparátu se stanoví biotestem na housenkách běláška zelného počet jednotek aktivity.

Příklad 3.

Živná půda v přechočkovacím a fermentačním tanku má složení 1,5 % sojové mouky, 0,5 % glukosy, 0,5 % kukuřičného škrobu, 0,03 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,002 %  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,002 %  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 0,1 %  $\text{CaCO}_3$ , živná půda v baňkách na třepačce pro inokulaci přechočkovacího tanku má složení 2 % glukosy, 1,5 % kvasničného autolysátu, 0,75 % peptonu, 0,6 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a 0,1 % oligobiogenních prvků (viz příklad 1.). Postup při inokulaci a fermentaci je stejný jako v příkladě 1.

Biomasa spor a inkusí se ochladí asi na 20°C a zahustí na separátoru typu Alfa Lavall, čímž se sušina zvětší asi 6 krát. Ke koncentrátu se přidá laktosa (5 až 25 % na sušinu a smáčedlo Triton X 5 až 10 %), míchá se asi 30 min. a suší ve sprayové sušičce (viz příklad 1.). Preparát se testuje na biologickou aktivitu na housenkách zavíječe paprikového a srovná se s mezinárodním standardem.

Příklad účinnosti :

Účinnosti bakteriálního preparátu na  $L_4$  housenky mola *Ephestia cautella*

| koncen. prep. | mortalita |       |       |       |       |       |       |      |
|---------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
|               | 1.den     | 2.den | 3.den | 4.den | 7.den | 8.den | 9.den | 10.d |
| 0,5 %         | -         | 60%   | 100%  |       |       |       |       |      |
| 0,3 %         | -         | 60%   | 100%  |       |       |       |       |      |
| 0,1 %         | -         | 30%   | 70%   | 100%  |       |       |       |      |
| 0,05 %        | -         | 10%   | 50%   | 60%   | 60%   | 60%   | 60%   | 70%  |
| kontrola      | -         | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -    |

Předmět vynálezu

235 786

1. Způsob výroby insekticidního bakteriálního preparátu proti housenkám škůdců z krystaloforních baílů druhu *Bacillus thuringiensis* vyznačený tím, že se variety *thuringiensis*, *alesti*, *kurstaki*, *sotto*, *dendrolimus*, *kenyae*, *galleriae*, *subtoxicus*, *entomocidus*, *morrisoni*, *nigeriae*, *tolworthi*, *darmstadtensis*, *toumanoffi*, *moritai* kultivují submersní metodou za stálého míchání a vzdušnění při teplotě 29 - 32°C zaočkováním do sterilní tekuté živné půdy obsahující asimilovatelné sacharidy a asimilovatelný organický zdroj dusíku, přičemž asimilovatelných sacharidů a asimilovatelného zdroje dusíku s obsahem růstových faktorů a vitaminů se použije v poměru 2 až 3 : 1, při výchozím pH 6,5 až 7,5, přičemž po ukončení fermentace a uvolnění spor a krystalů se tyto z fermentační půdy izolují a po přidání smáčedla, adhesivního prostředku a ochranné látky se suší při teplotách do 80°C.
2. Způsob podle bodu 1. vyznačený tím, že se jako ochranná látka použije laktosa nebo chlorid sodný.