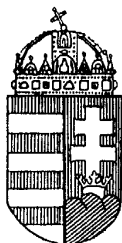


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

202 063 B

(22) Bejelentés napja: 1986.01.21.

(21) 287/86

(33) US

(32) 1985.01.22.

(31) 693.080

(83) *Bacillus thuringiensis* Var:

kurstaki HD-1 NRRL B-3792

Escherichia coli pSM1-17 NRRL B-15976

Pseudomonas fluorescens pCH2.1 NRRL B-15977

(41) (42) Közzététel napja: 1986.10.28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma

a Szabadalmi Közlönyben: 1991.02.28. SZKV/1991.02.

(51) Int Cl⁵

A 01 N 63/00

A 01 N 25/28

C 12 N 1/21

C 12 N 15/32

C 12 N 15/70

C 12 N 15/78

(72) Feltalálók:

Cummings Susan G., Chula Vista,
Kalifornia, Barnes Andrew C.,
San Diego, Kalifornia (US)

(73) Szabadalmaz:

Mycogen Corporation, San Diego, Kalifornia
(US)

(54) NYÚJTOTT HATÁSÚ BIOLÓGIAI PESZTICIDET TARTALMAZÓ KÉSZÍTMÉNY ÉS ELJÁRÁS A HATÓANYAG ÉS A TERMELŐ SEJTEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya nyújtott hatású biológiai peszticidet tartalmazó peszticid készítmény, mely hatóanyagként 0,01-95 tömeg%-ban vagy a *Bacillus thuringiensis* törzs vagy annak mutánsa vagy variánsa delta-endotoxint tartalmazó, kémiai reagensekkel kezelt sejtjeit, vagy az *Escherichia coli* vagy *Pseudomonas fluorescens* törzsekben a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxinját kódoló heterológ gén kifeje-

ződése útján közvetve vagy közvetlenül terhelt, és kívánt esetben kémiai reagensekkel kezelt peszticidet tartalmazza a szokásos hordozó-, vivő- és segédanyagokkal együtt.

A találmány tárgyához tartozik a hatóanyag előállítására és az azt termelő *Escherichia coli* és *Pseudomonas fluorescens* törzsek előállítására szolgáló eljárás is.

A leírás terjedelme: 12 oldal, ábra nélkül

HU 202 063 B

A találmány tárgya nyújtott hatású biológiai peszticidet tartalmazó készítmény és eljárás a hatóanyag és a termelő sejtek előállítására is.

A rendkívüli növekedés a mezőgazdasági termelésben több tényező eredménye; ezek közé tartozik a mezőgazdasággal, a jobb minőségű készítményekkel, a műtrágyák hozzáférhetőségével és a jobb tulajdonságú peszticidekkel kapcsolatos módszerek lényegesen jobb megértése. Az utóbbi tényező azonban nem nélkülözi az ártalmas vonzatokat sem, a környezetre való negatív hatása miatt. Ezért igen jelentős érdekek fűződnek a hatásos és a környezet szempontjából elfogadható peszticidek kifejlesztéséhez.

A környezet ökológiája szempontjából elfogadható peszticidek között vannak a különböző mikroorganizmusok, pl. a *Bacillus thuringiensis* által termelt fehérje-toxinok. A *B. thuringiensis* lisztumának vagy spóráinak alkalmazása peszticidként azonban jelentős árnyoldalkkal is bír. A peszticid élettartama viszonylag rövid a környezetben, így sokszor alkalmazást igényel, hogy megfelelő védelmet nyújtson. Következésképpen ezek a peszticidek nem gazdaságosak, összehasonlítva a hagyományosabb vegyi termékekkel, amelyeknek hosszabb ideig marad meg az aktivitása. Az élettartam meghosszabbítása a földeken komoly segítséget jelentene a biológiai- vagy fehérje-toxin alapú peszticidek alkalmazásának kiterjesztésében.

Amint fentebb jeleztük, több követelmény is van a peszticidekkel szemben, amely követelmények a mindenkori alkalmazással kapcsolatosak. Így pl. több esetben kívánatos olyan peszticidekkel rendelkezni, amelyek hosszantartó maradék aktivitással rendelkeznek a földeken, ugyanakkor nem gyülemlelenek fel a környezetben. Ezenkívül gazdasági megfontolásokból előnyös olyan peszticidekkel rendelkezni, amelyeknek ésszerűen széles spektrumú a biológiai aktivitásuk. A peszticideknek olyan lebomlási termékké kell elbomlaniuk, amelyek a környezet szempontjából elfogadhatók. Más megfontolások közt találjuk pl. a kiszerezhetőség könnyűségét, a peszticid-aktivitást, a stabilitást környezeti hatásokra, pl. fényre, vízre, élő szervezetre stb., és a hatást a hasznos vagy ártalmatlan organizmusokra a környezetben.

West, Crook és Burges: *J. Invert. Path.*, 43, 150, (1984), immunfluoreszcenciás módszert alkalmaz *B. thuringiensis*-nek talajban történő kimutatására. Megállapítása szerint a vegetatív sejtek gyors exponenciális görbe szerint tűnnek el; az életképes sejtek autolizálnak; a hővel elölt sejteket a talaj-mikroorganizmusok, pl. actinomycetes emésztik; és a paraspóra kristályok lassúbb, nem-exponenciális függvény szerint tűnnek el. Ugyanakkor az életképes spórák 91 napig aktívak maradtak, de csírázás ezalatt nem volt észlelhető. A hővel kezelt sejtek nem stabilizálódtak (rövid idő alatt eltűntek, mint az életképes sejtek), nem mutattak inszekticid hatást, és nincs is említés ilyen jellegű hatásról, vagy alkalmazási területről.

West a *Soil. Biol. Biochem.*, 16, 357, (1984) cikkében megállapítja, hogy a kristályos inszekticid aktivitásának gyors csökkenése a talajban jelentős mértékben csökkenti a *B. thuringiensis* talajban élő kár-

tevők elleni alkalmazhatóságát. A 4.265.880. lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás élő inszekticid patogének beágyazását írja le koacervátum-mikrogyöngyökbe. Az 51-5047. lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás fizikai-kémiai módszereket (például hőkezelést, fagyasztást) ismertet *B. thuringiensis* spórák előlésére olyan módon, hogy eközben a toxicitás fennmaradjon.

A találmány célja kompozíció mezőgazdasági termények és termékek megvédésére a kártevőktől, és annak előállítása. A találmány egyik megoldása szerint a toxint (peszticidet) termelő organizmusok teljes, vagyis nem lizált sejtjeit kémiai reagensekkel kezeljük, hogy a sejtben termelt toxin aktivitását meghosszabbítsuk, amikor a sejtet a célkártevő(k) környezetében alkalmazzuk. A találmány egy másik megoldása értelmében a peszticideket olyan módon állítjuk elő, hogy egy heterológ gént vezetünk be egy gazdasejtbe. A heterológ gén kifejeződése — közvetve vagy közvetlenül — a peszticid sejtben belüli termelődését és fennmaradását eredményezi. Ezeket a sejteket kezeljük azután olyan módon, ahogy fentebb leírtuk, olyan körülmények között, amelyek meghosszabbítják a sejtben termelt toxin aktivitását, amikor a sejteket a célkártevő(k) környezetében alkalmazzuk. Az így létrejött termék megőrzi a toxin toxicitását. Ezeket a természetes módon bezárt peszticideket azután ki lehet szerelni hagyományos technikákkal a cél kártevőt befogadó környezethez, pl. talajhoz, vízhez és lombhoz való alkalmazás céljaira.

A jelen találmány tárgyával összhangban javított tulajdonságú peszticideket — amelyek egyéb előnyök mellett megnyújtott aktivitással rendelkeznek — állítunk elő úgy, hogy a természetben előforduló peszticid-termelő mikroorganizmusokat módosítjuk, vagy a gazdaszervezetben kifejeződni képes heterológ gént befogadó peszticid-termelő mikroorganizmusokat, amely utóbbi mikroorganizmusokban az említett gén kifejeződése közvetlenül vagy közvetve peszticidek termelését eredményezi. A jelen találmány magában foglalja továbbá az organizmusok kezelését olyan reagensekkel, amelyek meghosszabbítják a sejtben termelt toxin aktivitását, amikor a sejtet a cél kártevő(k) környezetében alkalmazzuk. Az így létrejött termék megőrzi a toxin toxicitását.

A peszticidek széles választékát lehet előállítani, amelyek képesek intracellulárisan termelődni, elsősorban egysejtű mikroorganizmus-gazdasszervezetekben, pl. prokariótákban, úgy mint baktériumokban, vagy eukariótákban, pl. gombákban (elsősorban az élesztőkben és fonalas gombákban, pl. *Neurospora*-ban vagy *Aspergillus*-ban), vagy protistákban, mint pl. amőbákban, protozoákban, algákban és hasonlóknak.

A peszticid lehet bármilyen, mikroorganizmusok által termelt toxin. Lehet pl. polipeptid, amelynek toxikus aktivitása van valamilyen eukarióta többsejtű kártevő ellen, ilyen kártevők pl. a rovarok, úgy mint coleoptera (fedesele szárnyúak), lepidoptera (pikkelyesszárnyúak), diptera (kétszárnyúak), hemiptera (félfedesele szárnyúak), dermoptera és orthoptera (egyenesele szárnyúak), vagy pókfélék, vagy

haslábúak, vagy férgek, mint fonalférgek és laposférgek. A különböző érzékeny rovarok lehetnek bogarak, pillék, legyek, szöcskék, tetvek és százlábúak.

A gazdasejtben termelődő peszticid lehet aktív formában termelt polipeptid, de lehet prekursor vagy elő-forma is, amely esetén a toxin-aktivitás kifejléséhez pl. a kártevő is hozzájárul; ilyen pl. a *B. thuringiensis* var. *kurstaki* kristályos toxinja. Így a gén kódol egy olyan enzimet, amely egy metabolizált peszticid kompozíciójává alakít át.

A természetben előforduló toxinok: a *B. thuringiensis* var. *kurstaki* kristályos polipeptid toxinjai, amelyek pikkelyesszárnyúak ellen aktívak; a *B. thuringiensis* var. *israelensis* toxinjai, amelyek szúnyogok ellen aktívak; a *B. thuringiensis* M-7 toxinjai, amelyek fedelesszárnyúak ellen aktívak; a *B. thuringiensis* var. *aizawai* toxinjai, amelyek spodopterák ellen aktívak; és a *B. sphaericus* toxinjai, amelyek szúnyoglárva ellen aktívak. Más toxinok pl. a rovarpatogén gombák toxinjai, mint a *Beauveria bassiana* beauverinje és a *Metarhizium alfa* destrixinjei, vagy a széles spektrumú inszekticid vegyületek, mint pl. a *Streptomyces avermitilis* avermectinjei. A fentieket példázzák a következő tenyészetek:

– *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 — NRRL B-3792, amely a 4.448.885. lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban szerepel;

– *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* — ATCC 35646;

– *Bacillus thuringiensis* M-7 — NRRL B-15939;
– *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* — DSM 2803.

Az alábbi *B. thuringiensis* tenyészetek állnak rendelkezésre az Egyesült Államok Mezőgazdasági Minisztériumától (United States Department of Agriculture, USDA), Brownsville-ből, Texasból. Az igényeket a következő címre kell küldeni: Joe Garcia, USDA, ARS, Cotton Insects Research Unit, P.O. Box 1033, Brownsville, Texas 78520, USA.

B. thuringiensis HD 2

B. thuringiensis var. *finitimus* HD3

B. thuringiensis var. *alesti* HD4

B. thuringiensis var. *kurstaki* HD73

B. thuringiensis var. *sotto* HD770

B. thuringiensis var. *dendrolimus* HD7

B. thuringiensis var. *kenyae* HD5

B. thuringiensis var. *galleriae* HD29

B. thuringiensis var. *canadensis* HD224

B. thuringiensis var. *entomoridus* HD9

B. thuringiensis var. *subtoxicus* HD109

B. thuringiensis var. *aizawai* HD11

B. thuringiensis var. *morrisoni* HD12

B. thuringiensis var. *ostrinae* HD501

B. thuringiensis var. *tolworthi* HD537

B. thuringiensis var. *darmstadiensis* HD146

B. thuringiensis var. *toumanoffi* HD201

B. thuringiensis var. *kyushuensis* HD541

B. thuringiensis var. *thompsoni* HD542

B. thuringiensis var. *pakistan* HD395

B. thuringiensis var. *israelensis* HD567

B. thuringiensis var. *indiana* HD551

B. thuringiensis var. *dakota*

B. thuringiensis var. *tohokuensis* HD866

B. thuringiensis var. *kumanotoensis* HD867

B. thuringiensis var. *tochigiensis* HD868

B. thuringiensis var. *colmeri* HD847

B. thuringiensis var. *wuhanensis* HD525

Egyéb toxin-termelő deponált törzsek:

Bacillus cereus ATCC 21281

Bacillus moritai ATCC 21282

Bacillus popilliae ATCC 14706

Bacillus lentimorbus ATCC 14707

Bacillus sphaericus ATCC 33203

Beauveria bassiana ATCC 9835

Metarhizium anisopliae ATCC 24398

Metarhizium flavoviridae ATCC 32969

Streptomyces avermitilis ATCC 31267

A toxinnak nem szükséges azonosnak lennie a természetben előforduló toxinnal. A polipeptid toxinok lehetnek a természetben előforduló toxinok fragmensei; deléciós, transzverziós vagy tranzíciós mutációk kifejeződési termékei, ahol az aminosavak kettő vagy kevesebb százaléka megváltozott lehet; vagy ismétlődő szekvenciák, amelyeket a célba vett kártevő gazdaszervezet képes feldolgozni. Ezen kívül fúziós termékeket is lehet előállítani, ahol egy, öt vagy több aminosavat lehet hozzátenni az N-terminálshoz, hogy pl. a toxin(ok) csökkentett proteolitikus lebomlását megakadályozzuk. Bizonyos esetekben azonos vagy különböző toxinok sokaságát lehet kódolni és kifejezni, ahol „processing” helyeket lehet bevezetni az egyes toxin-részek közé a politoxinban.

Bemutatásra alkalmas gazdasejtek lehetnek prokarióták vagy eukarióták, ezek normálisan olyan sejtekre korlátozódnak, amelyek nem termelnek magasabbrendű organizmusokra, pl. emlősökre toxikus anyagokat. Olyan organizmusokat is lehet azonban alkalmazni, amelyek magasabbrendű organizmusokra toxikus anyagokat termelnek, ha ez a toxin nem stabil, vagy az alkalmazás szintje megfelelően alacsony ahhoz, hogy elkerüljük a toxicitás bármiféle lehetőségét emlős gazdaszervezetre. Gazdászervezatként különösen érdekesek lehetnek a prokarióták és alacsonyabbrendű eukarióták, pl. gombák. Prokariótákra, mind Gram-negatívokra, mind Gram-pozitívokra bemutatatható példák: Enterobacteriaceae, mint az *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella* és *Proteus*; Bacillaceae; Rhizobiaceae, mint a *Rhizobium*; Spirillaceae, mint a *Photobacterium*, *Zymomonas*, *Serratia*, *Acromonas*, *Vibrio*, *Desulfovibrio*, *Spirillum*; Lactobacillaceae; Pseudomonadaceae, mint a *Pseudomonas* és *Acetobacter*; Azobacteraceae és Nitrobacteraceae. Az eukarióták közt vannak a gombák, mint a *Phycomycetes* és *Ascomycetes*, amelyek magukban foglalják az élesztőket, mint a *Saccharomyces* és a *Schizosaccharomyces*; és a *Basidiomycetes* élesztők, mint a *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces* és hasonlóak.

Egy gazdasejt kiválasztásában a következő jellemzőkre kell különös figyelemmel lenni a termelés céljaira: a heterológ gén könnyű bevezetése a gazdaszervezetbe, a kifejeződő rendszer hozzáférhetősége, a kifejeződés hatékonysága, a peszticid stabilitása a gazdaszervezetben és a kiegészítő genetikai képességek jelenléte. Peszticid mikrokapszulaként való felhasználásánál figyelembe kell venni a következőket: a peszticid számára védő tulajdonságok, pl.

vastag sejtfalak, pigmentáltság, sejten belüli bezárt-ság vagy bezárt testecskek keletkezése; affinitás a levelekhez; az emlősökre való toxicitás hiánya; tet-szőlegesség a kártevők számára az elfogyasztás cél-jából; a pusztítás és rögződés könnyűsége a toxin ká-rosoodása nélkül stb. További megfontolások pl. a könnyű formulázhatóság és kezelhetőség, gazdasági szempontok, tárolási stabilitás stb.

Különösen érdekesek gazda-organizmusként az élesztők, mint a *Rhodotorula* faj, *Aureobasidium* faj, *Saccharomyces* faj és *Sporobolomyces* faj; levé-len élő organizmusok, mint a *Pseudomonas* faj, *Er-winia* faj és *Flavobacterium* faj; vagy egyéb organiz-musok, mint az *Escherichia*, *Lactobacillus* faj, *Ba-cillus* faj stb. Különösen alkalmas organizmusok er-re a célra a *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* stb.

A sejt általánosan érintetlen és lényegében szaporodó (proliferatív) formában van, amikor előljük, in-kább, mint spóra formában, bár bizonyos esetekben spórákat is lehet alkalmazni.

A sejteket lehet gátolni a szaporodásban külön-böző módokon, feltéve, hogy a technika nem ható károsan a peszticid tulajdonságaira, vagy nem csök-kenti a celluláris képességet a peszticid megóvásá-ban. Ezek a technikák lehetnek fizikai kezelések, ké-miai kezelések, változásokat okozó a sejt fizikai jel-legében vagy a sejt fizikai jellegét lényegében érin-tetlenül hagyók egyaránt.

A gazdasejtek inaktiválásához szolgáló techni-kák pl. a következők lehetnek: hőkezelés általában 50 °C és 70 °C hőmérsékletek között; fagyasztás; UV-besugárzás, liofilezés; toxinos kezelés, pl. anti-biotikumok, fenolok, anilidek pl. karbanilid és szali-cilanilid, hidroxikarbamid; kvaterner vegyületek, alkoholok, antibakteriális festékek, EDTA és amidí-nek, nem fajlagos szerves és szervetlen vegyi anya-gok, pl. klórozó, jódozó és brómozó szerek, aldehi-dek, pl. glutaraldehyd vagy formaldehyd, toxikus gá-zok, pl. ózon és etilén-oxid, peroxidok, psoralenek, szárítószer, stb. amelyeket mind lehet alkalmazni egyénileg és kombinációban is. A szer kiválasztása függ a szóban forgó peszticidtől, a gazdasejt termé-szetétől, a sejtszerkezet módosításának termé-szetétől, pl. a sejttal rögzítése és tartósítása kereszt-kötő szerekkel stb.

A sejtek általában megnövekedett szerkezeti sta-bilitással rendelkeznek, amely növeli a környezeti lebomlással szembeni ellenállást a termőföldön. Ahol a peszticid elő-formában van, az inaktiválás módszerét úgy kell kiválasztani, hogy ne gátolja az elő-forma átalakulásának folyamatát a peszticid érett formájába a cél-kártevő patogén által. Így pl. a formaldehyd kereszt-kötéseket létesít a fehérjékkel és meggátolhatja a polipeptid peszticid elő-formájá-nak átalakulását. Az inaktiválás vagy előlés módsze-re befolyással van a toxin biológiai hozzáférhetősége és biológiai aktivitása legalábbis jelentős részére.

A heterológ gént vagy géneket a gazdaszervezetbe bármilyen alkalmas módszerrel be lehet vezetni, vagy extrakromoszómális fenntartást biztosítva vagy integrálva a gazdaszervezet genomjába. (A „heterológ” azt akarja jelenteni, hogy a gén nincsen jelen a gazdaszervezetben, amelybe azt bevezetik, és

eza gén normálisan nem is található ilyen gazdaszer-vezetben. Ez azt jelenti, hogy még ha a gazda orga-nizmus és a heterológ gén cserélnek is információt, a heterológ gén normálisan nem található a vad típusú gazdasejtekben a természetben. Általában a „hete-rológ” kifejezés különböző nemzetségek fajtáit fog-lalja magában, mint gazdaszervezetet és gén-for-rást.)

Különböző konstrukciókat alkalmazhatunk, amelyek magukban foglalják a plazmidokból, víru-sokból vagy centromérákból származó replikációs rendszereket, kombinálva egy autonóm replikáló (ars) szegmenssel a stabil fenntartás érdekében. Ahol csupán az integrálás kívánatos, olyan konst-rukciókat alkalmazhatunk, amelyek a replikációról gondoskodnak, és vagy transzpozonok, vagy transz-pozon-szerű inszerciós aktivitással rendelkeznek, vagy homológiáról gondoskodnak a gazdaszervezet genomjával. Gyakran alkalmazunk olyan DNS szek-venciákat, amelyek rendelkeznek a szekvenciák kö-zötti heterológ génnel, amely homológ a gazdaszer-vezet genomjában levő szekvenciákkal, vagy kromo-szómálisan vagy plazmiddal. Kívánatos, hogy a hete-rológ gén több másolatban legyen jelen, lásd pl. 4.399.216. lajstromszámú amerikai egyesült álla-mokbeli szabadalmi leírást. Így a konjugálást, transzdukciót, transzekciót és transzformálást al-kalmazhatjuk a heterológ gén bevezetésére.

Nagyszámú plazmid áll jelenleg rendelkezésre, amelyek függnek az eukarióta és prokarióta repliká-ciós rendszerektől, ilyenek pl. a ColE1, P1 összefér-hetetlen plazmidok, pl. pRK290, élesztő 2mM plaz-mid, lambda stb.

Ahol extrakromoszómális elemet alkalmazunk, a DNS konstrukció kívánatosan olyan markert foglal magában, amely lehetővé teszi az ezt a konstrukciót tartalmazó gazdasejteknek a szelekcióját. A marker általában olyan megjelölés, amely valamilyen bioló-giai anyaggal szemben rezisztenciát biztosít, pl. an-tibiotikum-rezisztenciát vagy nehézfém-reziszten-ciát, vagy komplementálást nyújt, prototrófiát szol-gáltatva egy auxotróf gazdaszervezetnek stb. A replikációs rendszerek szolgáltathatnak speciális tulaj-donságokat, pl. „elszabadult” (runaway) repliká-ciót, magukban foglalhatnak cos sejteket, vagy más speciális vonások jelentkezhetnek.

Ahol a heterológ gén vagy gének átíró és transzlá-ciós kiindulási (iniciációs) és befejező (terminációs) szabályozó szignálokkal rendelkeznek, amelyet a gazdasejt felismer, gyakran elegendő alkalmazni ezeket a szabályozó jellemzőket a heterológ génnel együtt. Azokban a helyzetekben azonban, ahol a he-terológ gén módosul, így pl. egy adott szekvenciát eltávolítunk vagy olyan szekvenciát nyújtunk, amely a peszticid érett formáját kódolja, ahol a tel-jes gén egy prekurzort kódol, gyakran szükséges ma-nipulálni a DNS szekvenciát olyan módon, hogy egy átíró iniciációs szabályozó szekvenciát szolgál-tatunk, amely eltér a természetes szekvenciától.

Az átírási iniciációs szekvenciák széles választé-ka létezik gazdaszervezetek széles választékához. A szekvencia a peszticid konstitutív kifejeződéseit szolgáltathatja, vagy szabályozott kifejeződést, ahol a szabályozás indukálható lehet valamilyen vegyi anyag, pl. egy metabolit, vagy hőmérséklet, vagy egy

szabályozható represszor által, lásd pl. a 4.347.920. lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírást. A promotor megfelelő kiválasztása függ egy sor tényezőtől, a promotor erősségétől, a promotor hatásától a sejtek életképességére, a sejtre endogén szabályozó mechanizmus hatásától a promotorra stb. Nagyszámú promotor áll rendelkezésre sokféle forrásból, beleértve kereskedelmi forrásokat is.

A heterológ peszticid gént tartalmazó celluláris gazdaszervezetet lehet növeszteni bármilyen alkalmas tápközegen, ahol a DNS konstrukció szelektív előnyt nyújt, szelektív tápközeget alkalmazva olyan módon, hogy az összes vagy lényegében az összes sejt megtartsa a heterológ gént. Ezeket a sejteket lehet azután hagyományos módokkal összhangban kinyerni és módosítani az alább leírt különböző módokon. Egy másik módszer szerint a sejteket a kinyerés előtt rögzítjük.

A toxint tartalmazó gazda-organizmust kezelhetjük acélból, hogy: először, növeljük a szerkezeti séríthetőséget; másodsor, hogy a toxin megnövekedett proteolitikus stabilitását megnyújtsuk, a toxint olyan módon módosítva, hogy csökkenjen érzékenysége a proteolitikus lebomlásra, és/vagy a sejten természetesen módon jelen levő proteázok proteolitikus aktivitása csökkenjen. A sejteket előnyösen érintetlen stádiumban módosítjuk, és amikor a toxin fehérje lényeges felépítése történik. Ezeket a módosításokat különböző utakon lehet elérni, mint pl. széles kémiai reaktivitás spektrummal rendelkező vegyi reagens alkalmazásával. Az érintetlen sejteket kombinálhatjuk a kémiai reagenset tartalmazó folyékony reagens közeggel, keveréssel vagy anélkül, -10°C és 60°C közötti hőmérséklet tartományban. A reakcióidőt empirikusan lehet meghatározni és ez nagymértékben változhat a reagensektől és a reakciókörülményektől függően. A sejtkoncentráció kb. 10^2 és 10^6 /ml között változhat.

Különösen alkalmas kémiai reagens a halogénezőszerek, különösen a 17–80 rendszámú halogének. Legcélszerűbben jódot alkalmazhatunk enyhe körülmények között és megfelelő ideig, hogy elérjük a kívánt eredményt. Más technikák is alkalmazhatók: a kezelés aldehidekkel, pl. formaldehiddel és glutáraldehiddel; fertőtlenítőszerrel, pl. zephiran kloriddal és cetil-piridinium-kloriddal; alkoholokkal, pl. izopropanollal és etanollal; különböző szöveti rögzítővel [lásd: Humason, Gretchen L.: Animal Tissue Techniques (Állati szövettechnikák), kiadó: W. H. Freeman és Company, 1967]; vagy a fizikai (hő) kezelés kombinálása kémiai szerekekkel, hogy meghosszabbítsuk a sejten termelt toxin aktivitását, amikor a sejtet a cél kártevő(k) környezetében alkalmazzuk.

A jóddal végzett halogénezésnél a hőmérséklet általában 0 és 50°C közti tartományban van, de a reakciót kényelmesen kivitelizhetjük szobahőmérsékleten. Véghezvihetjük a jódozást trijodidot vagy jódot alkalmazva $0,5$ – 5% koncentrációban savas vizet közegben, különösen vizes karbonsavas közegben, amely $0,5$ – 5 mól/liter közt változhat. Előnyös, ha ecetsavat alkalmazunk, bár más karbonsavak, általában 1 – 4 szénatomszámú karbonsavak, szintén alkalmazhatók. A reakcióhoz szükséges idő

1 perctől 24 óráig terjedő tartományban van, általában 1 és 6 óra között. Minden maradék jódot el lehet távolítani redukálószerrel, pl. ditionittal, vagy nátrium-tiosulfáttal végzett reakcióval, vagy más redukálószerrel, amelyek alapvetően összeférhetők a mezőgazdasági területen való felhasználással. Ezen kívül a módosított sejteket további kezelésnek is ki lehet tenni, pl. mosásnak, hogy eltávolítsuk az összes reakcióközeget, izolálásnak száraz formában, és kiszerezésnek a szokásos permet-tapadást fokozó anyagokkal, szórás-elősegítő anyagokkal és adjuvánsokkal, amelyeket mezőgazdasági felhasználásban általánosan alkalmaznak; mindezek jól ismertek azok számára, akik a szakterületen jártasak.

Különösen előnyösek azok a reagensok, amelyek képesek keresztkötéseket létesíteni a sejtfalban. Erre a célra a szakirodalomban egy sor reagens ismeretes. A kezelés a peszticid megnövekedett stabilitását kell, hogy eredményezze. Ez azt jelenti, hogy a peszticid megnövekedett állandósága és maradék aktivitása érvényesül a mezőgazdasági felhasználás körülmények között is. Így olyan körülmények között, ahol a kezelt sejt peszticid-aktivitása csökken, a kezelt sejt aktivitása 1 – 3 -szor hosszabb időtartamon keresztül megmarad.

A sejteket számos formában lehet kiszerezni. Lehet alkalmazni nedvesíthető porokként, szemcsékként vagy porokként, különböző inert anyagokkal keverve, ilyen anyagok lehetnek pl. szervesetlen anyagok (filloszilikátok, karbonátok, szulfátok, foszfátok stb.), vagy növényi anyagok (kukoricacsutka-őrlemény, rizskorpa, dióhéj stb.). A kiszerezési forma magában foglalhat permet-tapadást fokozó anyagokat, szórás-elősegítő anyagokat, stabilizálószereket, egyéb peszticid hozzáadékokat, vagy felületaktív anyagokat. A folyadék formájú kiszerezés lehet víz-alapú vagy nem víz-alapú, és lehet alkalmazni habként, gélként, szuszpenzióként, emulziót kialakító koncentrátumként stb. A kiegészítő anyagok lehetnek reológiai tulajdonságokat befolyásoló szerek, felületaktív anyagok, emulgeátorok, diszpergálószerek vagy polimerek.

A peszticid-koncentráció széles határok között változhat, a szóban forgó kiszerezés természetétől függően, különösen attól függően, hogy ez koncentrátum vagy közvetlenül felhasználható készítmény. A peszticid legalább 1 tömeg% formában van jelen, de lehet 100 tömeg%-ban is. A száraz kiszerezések általában 1 – 95 tömeg% közti peszticid mennyiséget tartalmaznak, míg a folyékony kiszerezések 1 – 60 tömeg% szilárd anyagot tartalmaznak a folyadékfázisban. A kiszerezések általában kb. 1E^2 és 1E^4 sejt/mg közti mennyiséget tartalmaznak. Ezeket a kiszerezéseket kb. 2 oz-tól (folyadék vagy száraz) 2 vagy több lb/ha-ig (2 oz = 2 uncia = $56,7$ g; 1 lb = 2 font = $907,2$ g).

A kiszerezéseket a kártevő(k) környezetében lehet alkalmazni, pl. növényeken, talajban vagy vízben porlasztva, porítva, szórva stb.

Az alábbi példák bemutatás céljait szolgálják, és nem céljuk a korlátozás.

1. példa

B. thuringiensis érintetlen (autólízis előtti) spóratartó sejtjeinek kezelése után lugol-jóddal, a sejte-

ket elöljük, ezek azonban megőrzik toxicitásukat *Trichoplusia ni* lárvák ellen.

A *Bacillus thuringiensis* (HD-1) érintetlen sejtjeit centrifugálással kinyerjük éppen a spórázó sejtek autolízise előtt, és a sejt-üledéket ionmentesített vízben szuszpendáljuk, $6,0 \cdot 10^9$ sejt/ml koncentrációt adva. A sejtuszpenzió egy alikvotját $1,5 \cdot 10^8$ sejt/ml-re hígítjuk és 1%-os lugol jó hatásának tesszük ki 4 órán át szobahőmérsékleten (az 1%-os lugol jó oldat 1,0 g kálium-jodidot, 0,5 g jódot és 1,0 ml jégecet tartalmaz 1 literben). A kezelt sejteket mossuk és újra szuszpendáljuk steril, ionmentesített vízben, hogy $6,0 \cdot 10^9$ sejt/koncentrációt nyerjünk. Élő sejtet nem mutatunk ki lemez-számlálásos módszerrel táp-agaron 4 órás jódos kezelés után. A lugol oldattal kezelt és a nem kezelt kontroll sejteket ezután biológiai mérésnek vetjük alá *T. ni* lárvák elleni toxicitásra.

Mivel a jelen találmány szerinti sejtek természetben előforduló sejtek, nem szükséges kezelni ezeket pusztító körülmények között abból a célból, hogy a jelen találmány előnyeiket realizáljuk. Így a sejt-

Bacillus thuringiensis érintetlen, spórákat tartalmazó sejtjeit centrifugálással kinyerjük és az így létrejött üledéket steril, ionmentesített vízben szuszpendáljuk (10^9 sejt/ml), 70°C hőmérsékleten kezeljük 30 percen át és hűtőszekrényben tároljuk 9

tek kezelését, amint itt leírjuk, optimalizálni képes bárki, aki a szakterületen jártas, hogy elérje a toxin (peszticid) aktivitása meghosszabbításának legmagasabb szintjét a cél kártevő(k) környezetében.

B. A biológiai mérési folyamat

Lugol oldattal előlt sejtek vagy kezeletlen élő HD-1 sejtek hígításait összekeverjük állandó térfogatú lárvá-táplálék adaggal. Egy egyedi, 5 napos *T. ni* lárvát teszünk ezután mindegyik táplálék-adaghoz. 18 lárvát vizsgálunk meg hígításonként. A lárvákat 6 nap után megvizsgáljuk és az elpusztult lárvák számát rögzítjük. Az eredményeket az 1. Táblázat mutatja be. Ez az elpusztult lárvák százalékát adja meg.

2. példa

Stabilitásvizsgálat

Bacillus thuringiensis érintetlen, spórákat tartalmazó sejtjeit kezeljük 1%-os lugol oldattal 4 órán át szobahőmérsékleten, ionmentesített vízzel mossuk, és hűtőszekrényben tároljuk 52 napon át. Ezután az időtartam után is egészben marad a sejt, nincsen bizonyíték a lízisre (spórák és kristályok kibocsátása).

zünk steril, 500 ml-es lombikba, és 200 ml kísérleti oldatot adunk hozzá.

2. Steril talaj-preparátum: 40 g talajt helyezünk steril, 500 ml-es lombikba, és 1 órán át autoklávozzuk, mielőtt 200 ml kísérleti oldatot hozzáadnánk. A

1. táblázat

Lugollal kezelt érintetlen, spórákat tartalmazó *Bacillus thuringiensis* (HD-1) sejtek biológiai mérése

Sejt hígítás	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5
HD-1, kezeletlen	100	100	68,8	0	0
Lugollal kezelt	94,4	61,0	0	0	0

napig. Ezután az időtartam után láthatóan az összes sejt lizálódott, spórákat és kristályokat bocsátva ki.

3. példa

Talaj-kísérleti folyamat

Bacillus thuringiensis HD-1 készítmény

Bacillus thuringiensis HD-1 érintetlen spórákat tartalmazó tenyészetét centrifugálással kinyerjük és a sejtüledéket újra szuszpendáljuk 400 ml 1%-os lugol jó oldatban ($4 \cdot 10^8$ sejt/ml). A jódos sejtuszpenziót 3 órán át szobahőmérsékleten kevertjük, háromszor mossuk és újra szuszpendáljuk 400 ml steril, 0,1 mól/literes nátrium-foszfát pufferban, pH 6,9. Nem tudunk élő *Bacillus thuringiensis* HD-1 sejtet kimutatni tápagon (10^6) jóddal történő kezelés után, és a mikroszkópos kezelés feltárja, hogy az összes sejt érintetlen (nem lizált).

Dipel készítmény:

Dipel (0,1 g, Abbat Laboratories, 16000 nemzetközi potenciál-egység/mg; 5188. listaszám), amely *Bacillus thuringiensis* HD-1 sejteket tartalmaz, mérünk 400 ml steril, 0,1 mól/literes nátrium-foszfát pufferba.

Kísérleti felállítás:

1. Nem steril talaj-preparátum: 40 g talajt helye-

45

talaj-szuszenziókat tartalmazó lombikokat forgó rázógépen (200 fordulat/perc) inkubáljuk, szobahőmérsékleten. Az egyes talaj-szuszenziók 30–40 ml-es mintáit 4 rétegű sajtkendőn átszűrjük és saláta növény leveleire permetezzük, hogy ezt követően mérhessük a toxicitást *T. ni* lárvái ellen.

B. *thuringiensis* toxin mérése táplálék-gátlással levél gátlási méréssel

Romaine saláta palánta leveleit frissen készített Dipel standard koncentrációkkal (1,0, 19 g/100 ml, 1/10, 1/20 és 1/100) permetezzük, és kísérleti oldatokkal, 24 órával felhasználás előtt.

A standardokkal és kísérleti oldatokkal kezelt leveleket eltávolítjuk a növényekről, egyedileg lemérjük, és egy-egy petricsészébe helyezjük. Tíz éhező, 7 napos *T. ni* lárvát alkalmazunk mindegyik levélhez, és hagyjuk ezeket táplálkozni a levélen mintegy 24 órán át 25°C hőmérsékleten. A táplálási időtartam végén a leveleket újra mérjük és az átlagos súlyvesztést meghatározzuk minden egyes kezeléshez.

A fentebb leírt körülmények között a levél súlyvesztése logaritmikus-lineáris függvénye a toxin-koncentrációnak 0,19 mg/ml–0,019 mg/ml Dipel oldattal egyenértékű tartományban (16000 nemzetközi potenciál-egység/mg). Így a frissen készített Di-

50

55

60

65

pel oldatok koncentrációit permetezzük saláta-növényre és mindenegyes koncentrációnál a mérést elvégezzük, hogy ez standardként szolgáljon, ehhez lehet azután hozzámérni a levelekre permetezett kísérleti *Bacillus thuringiensis* HD-1 toxin oldatok különböző koncentrációit. A 2. Táblázatban található adatok megmutatják az eredeti toxicitás százalék-

A *Bacillus thuringiensis* HD-1 fehérje-kristály inaktiválását a talaj mikroorganizmusainak aktivitása miatt mutatjuk be (West, 1984). A 2. táblázat eredményei azt demonstrálják, hogy amikor Dipel-t és elő-lizált, lugolos jó-d-oldattal kezelt *Bacillus thuringiensis* HD-1 készítményt azonos körülmények

kában (1 nap), hogy különböző időtartamokig talajban inkubálva, majd ezt követően levél-gátlási méréssel mérve milyen a maradék aktivitás.

Nemcsak saláta levelét, hanem más növények leveleit is lehet alkalmazni a *Bacillus thuringiensis* hatékonyságának mérésében.

(Kbp) *HindIII* DNS fragmenst tartalmaz, amely magában foglalja a δ -endotoxin gént a *Bacillus thuringiensis* HD 73 50 md-s plazmidjából. Megfelelő toxin fejeződik ki ebből a génből *E. coli*-ban, hogy az érintetlen sejtet toxikussá tegye káposztalepke hernyó ellen. A DNS fragmens további módosítását vé-

2. táblázat

A toxicitás megmaradása talajban, az eredeti toxicitás megmaradásának %-ában

Napok száma a talajban való inkubálás kezdetétől	Dipel (spóra-kristály készítmény)		Elő-lizált, lugol-jód oldattal kezelt <i>Bacillus thuringiensis</i> HD-1 (teljes sejt készítmény)	
	steril	nem steril	steril	nem steril
1	100	100	100	100
5	81	0,5	133	100
8	74	5,3	80	76
15	-	-	87	117

között inkubálunk, a Dipel (spóra-kristály) készítmény gyorsan degenerálódik, míg a lugolos jó-d-oldattal kezelt sejtek lényegében változatlanok maradnak.

A fenti eredményekből nyilvánvaló, hogy a teljes mikrobiológiai sejt kémiai kezelését olyan módon lehet végrehajtani, hogy a polipeptid toxin aktivitása megmaradjon, ugyanakkor a sejt is stabil marad a tárolás körülményei között. Ez megnövekedett maradék toxin-aktivitást eredményez a szabadföldi körülmények között.

4. példa

Heterológ gén megalkotása és transzformálás megfelelő gazdaszervezetekbe

A megoldást *Pseudomonas aeruginosa* klónnal kezdjük, amely a Northern Regional Research Laboratories-tól szerezhető be (NRRL B-12127), amely a széles gazdaszervezet-tartománnyal bíró pRO1614 „ingázó” plazmiddal rendelkezik [J. Bact. 150, 60 (1982); és 4.374.200. lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás]. A plazmidnak egyedi *HindIII*, *BamHI*, *SalI* és *PvuII* restrikciós helyei vannak, egy *PstI* beiktatása, amely a karbenicillin rezisztencia gént foglalja magában, és egy *P. aeruginosa* replikációs rendszere, ahol a *HindIII*, *BamHI* és *SalI* restrikciós helyek egy tetraciklin rezisztencia génen belül vannak. A plazmid további részei pBR322-ből származnak. Egy másik plazmid, a pSM1-17 is letétbe van helyezve, mint *E. coli* klónja (NRRL B-15976). A letétbe behelyezés a Northern Regional Research Laboratory-nál (U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois 61604, USA) történt. A pSM1-17 plazmid ampicillin rezisztenciát ad *E. coli*-ra és egy 6,8 kilobázis páros

gezzük el, hogy növeljük a toxin kifejeződését és végrehajtsuk a toxin kifejeződését egy másik gazdaszervezetben, *Pseudomonas fluorescens*-ben is. Aból a célból, hogy eltávolítsuk a nem kívánt DNS-t a 6,8 Kbp-s fragmensről, a pSM1-17-et *BamHI*-el emésztjük, hogy a kör alakú plazmidot annál a helynél nyissuk ki, amely a legközelebb van a toxin gén 5' végétől, és *Bal31* exonukleázal kezeljük, hogy a 6,8 Kbp-s *HindIII* beiktatást mintegy 2,9 Kbp-re csökkentsük. A DNS szabad végeit Klenow-polimerázzal kitöltjük, *BamHI* kapcsolókat (linkereket) adunk hozzá, és a lineáris DNS-t ligáljuk, hogy újra képezzük a kör alakú plazmidot. Az így létrejött pFG270 plazmidot *XhoI*-el emésztjük, hogy a kör alakú plazmidot annál a helynél nyissuk ki, amely legközelebb van a toxin gén 3' végéhez. *SalI* kapcsolókat adunk hozzá, a plazmidot kör alakú formájában ligáljuk, és az így létrejött pFG10.6 vektort *E. coli*-ban szaporítjuk. A pFG0.6-ot *SalI*-el és *BamHI*-el teljesen emésztjük és az így létrejött 2,1 Kbp-s fragmenst, amely a toxin gént tartalmazza, gélelektroforézissel tisztítjuk, és a pRO1614 plazmid *BamHI* és *SalI* helyeire ligáljuk. Az így létrejött pCH2.1 plazmidot *E. coli*-ban szaporítjuk, és *Pseudomonas fluorescens* transzformálására alkalmazzuk, karbenicillin rezisztenciát adva át, és azt a képességet, hogy δ -endotoxint szintetizáljon. A *Pseudomonas fluorescens* (pCH2.1)-et az NRRL-nél letétbe helyeztünk, ahol az az NRRL B-15977 letéti számot kapta. A pSM1-17 és a pCH2.1 plazmidokat a letéti helyen 1985. július 2-án helyeztük letétbe. A következő bemutatató kísérletekben *P. fluorescens* (pCH2.1)-et alkalmazunk nem-transzformált sejtekkel, mint kontrollal együtt.

Az *E. coli* (pSM1-17)--NRRL B-15976 és *P.*

fluorescens (pCH2.1)---NRRL B-15977 tenyészet-
letétek részévé váltak az NRRL letéti hely állandó
gyűjteményének, ahol legalább 30 évig fenn kell tar-
tani ezeket. Ezek a letétek a köz rendelkezésre áll-
nak egy szabadalom oltalma alatt, amely magában
foglalja ezeket. A letétek rendelkezésre állnak,
amint ezt a külföldi szabadalmi törvények előírják,
azoknak az országoknak a számára is, ahová a szó-
ban forgó bejelentésnek, vagy valamely származé-
kának a megfelelő változatát benyújtották. Meg le-
het érteni azonban, hogy a letét hozzáférhetősége
nem ad jogot a szóban forgó találmány szerinti eljárás
gyakorlatbavételéhez a kormányközi eljárások
által garantált szabadalmi jogok megsértésével.

5. példa

Heterológ gént gazdaként befogadó mikrobák ke-
zelése és vizsgálata

A Pseudomonas előljük vagy 1%-os lugolos jódo-
oldattal (100 g KI, 50 g I₂, 100 ml jégecet 1 liter steril
desztillált vízben), vagy 2%-os formalin oldattal ke-
zelve, mindkettőt szobahőmérsékleten végezve.

A következő tanulmányban a sejtek előlítésének
különböző módszereit alkalmazzuk, hogy meghatá-
rozzuk a hatást a sejt stabilitására ultrahangos keze-
lésnél. A P. fluorescens 33 törzs nem transzformált
törzs, amely nem tartalmazza a Bacillus thuringien-
sis toxint, míg a pCH törzs tartalmazza a 2,1 kb-s
toxin gént. Az első tanulmányban a 33. törzs és a pCH

P. fluorescens két literes tenyészetéből --- Bacil-
lus thuringiensis toxinnal vagy anélkül --- származó
sejtüledéket két részre osztunk. A sejtek felét 1%-os
lugol-jódoldattal kezeljük 4 órán át, míg a másik fel-
ét jégen tartjuk. A mosott, lugollal kezelt sejteket és
a nem kezelt sejteket újból szuszpenzióba visszük 10
ml steril, ionmentesített vízben. 9 ml ilyen szuszpen-
ziót ($10E^9$ – $10E^{12}$ sejt/ml) három fiatal salátára per-
metezzük. A három bepermetezett növényt egyedi,
zárt kamrába helyezük, és 50–75 Trichoplusia ni
lárvát alkalmazunk a növényekhez. A növényeket
akkor tekintjük védettnek, ha a levélzeten nincs lát-
ható veszteség a megfigyelési időtartam alatt.

A következő tanulmányban újonnan kikelt ká-
posztalepke-hernyókat helyezünk a biológiailag
vizsgálni kívánt anyag cseppecskéit tartalmazó Pet-
ri-csészébe. A lárvák felszívják a folyadékot, majd
eltávolítjuk innen a lárvákat, és a lárvák étrendjét
tartalmazó kis edényekbe helyezük ezeket. A lár-
vákat hét nap után megvizsgáljuk és az elpusztult
állatok teljes számát rögzítjük. Az itt következő 4.
táblázat mutatja be az eredményeket.

törzs állandósult (stacioner fázisú készítményeit
centrifugálással kinyerjük, és a sejtüledéket steril,
ionmentesített vízben szuszpendáljuk $10E^{10}$, illetve
 $10E^9$ koncentrációkra. Sejtek alikotjait tesszük ki
hőkezelésnek, 70 °C hőmérsékletű vízfürdőben kü-
lönböző időtartamokon át, és a sejt életképességét
King-féle B agaron végzett lemezszámlálással mér-

3. táblázat
1. növényvizsgálat --- P. fluorescens

Mikroorganizmus	Kezelés	Élő mikroorganiz- musok száma sejt/ml	Összes lárvák száma	Védelem
P. fluorescens	Élő	$2,5 \cdot 10E^{11}$	75	nem védett
P. fluorescens + Bacillus thū- ringiensis toxin	Élő	$3,1 \cdot 10E^{11}$	75	védett
P. fluorescens	1% lugol-jód- oldat, 4 óra	0	75	nem védett
P. fluorescens + Bacillus thū- ringiensis toxin	1% lugol- jódoldat, 4 óra	0	75	védett

*A kísérleti elrendezés: 1 nap: 25 db 2 napos lárvát adunk a növényekhez; 3. nap: 50 db 5 napos lárvát
adunk a növényekhez; 10. nap: elvégezzük a megfigyelést

4. táblázat
1. biológiai vizsgálat --- P. fluorescens

Mikroorganizmus	Kezelés	Elpusztult lárvák száma/összes lárva	Elpusztult lárvák %-a	Élő sejt- szám/ml
P. fluorescens	Élő	0/15	0	$8 \cdot 10E^{11}$
P. fluorescens + Bacillus thū- ringiensis toxin	Élő	11/18	62	$2,5 \cdot 10E^{12}$

4. táblázat folytatása
1. biológiai vizsgálat — *P. fluorescens*

Mikroorganizmus	Kezelés	Elpusztult lárvák száma/összes lárv	Elpusztult lárvák %-a	Élő sejt-szám/ml
<i>P. fluorescens</i>	1% lugol, - 4 óra	0/15	0	0
<i>P. fluorescens</i> + <i>Bacillus thuringiensis</i> toxin	1% lugol, 4 óra	8/13	62	0

2. biológiai vizsgálat — *P. fluorescens*

Mikroorganizmus	Kezelés	Elpusztult lárvák száma/összes lárv	Elpusztult lárvák %-a	Élő sejt-szám/ml
<i>P. fluorescens</i>	Élő	0/15	0	$3,7 \cdot 10^E^{11}$
<i>P. fluorescens</i> + <i>Bacillus thuringiensis</i> toxin	Élő	3/20	15	$4,5 \cdot 10^E^{12}$
<i>P. fluorescens</i>	1% lugol, 4 óra	0/15	0	0
<i>P. fluorescens</i> + <i>Bacillus thuringiensis</i> toxin	1% lugol, 4 óra	8/15	53	0

3. biológiai vizsgálat — *P. fluorescens*

Mikroorganizmus	Kezelés	Elpusztult lárvák száma/összes lárv	Elpusztult lárvák %-a	Élő sejt-szám/ml
<i>P. fluorescens</i> + <i>Bacillus thuringiensis</i> toxin	Élve-fagyasztott 14 napos	9/10	90	$2,5 \cdot 10^E^{12}$
<i>P. fluorescens</i>	1% lugol, 4 óra	1/15	7	0
<i>P. fluorescens</i> + <i>Bacillus thuringiensis</i> toxin	1% lugol, 4 óra	11/15	73	0
<i>P. fluorescens</i>	2% formalin 4 óra	0/15	0	0
<i>P. fluorescens</i> + <i>Bacillus thuringiensis</i> toxin	2% formalin, 4 óra	10/15	67	0

4. biológiai vizsgálat — *P. fluorescens*

Mikroorganizmus	Kezelés	Elpusztult lárvák száma/összes lárv	Elpusztult lárvák %-a	Élő sejt-szám/ml
<i>P. fluorescens</i>	Élő	6/14	30	$3 \cdot 10^E^{11}$
<i>P. fluorescens</i> + <i>Bacillus thuringiensis</i> toxin	Élő	20/20	100	$3 \cdot 10^E^{10}$

4. biológiai vizsgálat — *P. fluorescens*

Mikroorganizmus	Kezelés	Elpusztult lárvák száma/összes lárv	Elpusztult lárvák %-a	Élő sejt-szám/ml
<i>P. fluorescens</i>	1% lugol, 4 óra	0/20	0	0
<i>P. fluorescens</i> + <i>Bacillus thuringiensis</i> toxin	1% lugol, 4 óra	18/20	90	0
jük [lásd King, E. O. és munkatársai: J. Lab. and Clin. Med. 44, 304 (1954)]. A tápközeg a következő alkotórészeket tartalmazza: proteóz pepton, 3. számú, 2,0%; Bacto agar, 1,5%; glicerin, vegyileg tiszta, 1,0%; K₂HPO₄ (vízmentes), 0,15%; MgSO₄·7H₂O, 0,15%, pH= 7,2-re beállítva. A 33. törzs lényegében teljesen elpusztult 5 perc alatt, míg a pCH törzsnél 10 perc után nem mutatkozott élő sejt. A 33. törzs sejtjeit [nem kezelt, hővel kezelt, vagy lugollal kezelt (1%-os lugol-jódoldat, 2 óra, szobahő- A pCH törzs sejtjeit (5.10E¹⁰/ml) hőkezeltük 70 °C hőmérsékletű vízfürdőben és toxicitásra megvizsgáljuk biológiai módszerrel T. ni lárvák ellen. A biológiai mérési folyamat újonnan kikelt káposztalepke hernyókat alkalmaz, amelyeket a biológiailag vizsgálандó anyagok cseppcskéit tartalmazó petri- mérséklet)] szuszpendáljuk 10 ml ionmentesített vízben, hogy mintegy 10E⁹/ml sejtkoncentrációt kapjunk. A sejtszuspenziót azután ultrahangos kezelésnek tesszük ki 5 percen át Bronson 200 Sonifier készüléken (10. mikroszondát, 50% impulzus kitöltési tényezőt és löktető módot alkalmazva). A sejtszuspenzió optikai sűrűségét (575 nm) mérjük az ultrahangos kezelés előtt és után. A csökkenés az optikai sűrűségben a sejt szétzúzódását jelzi. Az eredményeket az itt következő 5. táblázat adja meg. csészébe helyezzük. A lárvákat hagyjuk, hogy magukba szívják a folyadékot, majd kis edényekbe visszük át ezeket, amelyek a lárvák étrendjét tartalmazzák. A lárvákat 6 nap után megvizsgáljuk és az előlt állatok teljes számát rögzítjük.				
		15		
		20		
		25		
		30		

5. táblázat
Ultrahangos kezelés — *P. fluorescens* 33.

Kezelés	Ultrahangos előkezelés	Optikai sűrűség (575 nm)	Ultrahangos utókezelés
Élő	0,24		0,05
Lugol-oldat (1%, 2 óra, szobahőmérséklet)	0,20		0,19
Hőkezelés 70 °C			
1	0,22		0,06
3	0,21		0,07
5	0,22		0,09
15	0,20		0,10
30	0,21		0,11
60	0,19		0,13
90	0,22		0,13

6. táblázat
Hőkezelt P. fluorescens biológiai mérése

Kezelés (70 °C) Idő (perc)	Élő sejtek száma/ /összes sejtek	Elölt lárvák száma/ összes lárv	Elölt lárvák %-a
3	2.10E ⁵ /5.5.10E ¹⁰	8/8	100
5	2.10E ⁶ /5.5.10E ¹⁰	8/8	100
10	0/5.5.10E ¹⁰	8/7	100

P. fluorescens + Bacillus thuringiensis toxin (pCH törzs) lugollal kezelt sejtjei fennmaradásának elemzését végezzük el melegházban (1) Romaine saláta leveleit bepermetezve a peszticidet tartalmazó sejtekkel; (2) a kezelt növényeket melegházi körülmények között tartva 19 napig (a melegház UV-fény-áteresztő tetővel van fedve), és (3) a leveleken megmaradó káposztalepkehernyó elleni peszticid aktivitást mérve, levél-gátlású méréssel. A Bacillus thuringiensis toxin mérése az etetési gátlással azonos azzal, amelyet korábban leírtunk, a növények bepermetezésének módszere pedig az 5. példában van leírva. Ebben a kísérletben 1,0 toxin-aktivitási szint ekvivalens azzal a peszticid aktivitással, amelyet 0,19 g Dipel/100 ml permettel érünk el, mintegy 10 ml/növény arányánál (azaz éppen a lecsurgás előtti állapotnál).

Amint a 7. táblázatban látható, 11 nap után a Pseudomonas készítmények még teljesen aktívak, míg a Dipel-es minta elveszti kezdeti aktivitásának 2/3-át. Mi úgy értelmezzük, hogy ezek az adatok azt jelentik, hogy a rögzített Pseudomonas sejt bizonyos módon védi a peszticid toxint az inaktiválódástól a levél felületén.

7. táblázat
Melegházi fennmaradási adatok

Nap	Aktivitás	
	pCH	Dipel
1	0,75	1,0
5	1,15	0,85
8	1,1	1,2
11	1,0	0,3
19	0,13	0,01

A fenti eredményekből nyilvánvaló, hogy a toxint tartalmazó elölt baktériumok sok előnyt nyújtanak, miközben az élő baktériumok peszticid aktivitásának egységét vagy jelentős részét megőrzik. Az élettelen baktériumok fenntartása tároláshoz, szárításhoz és alkalmazáshoz sokkal kényelmesebb és gazdaságosabb, mint az élő organizmusok alkalmazása. Ugyanakkor az organizmusok a toxinok beburkolásos védelmét nyújtják úgy, hogy fenntartják a toxin biológiai aktivitását hosszú időtartamon át. Ezen kívül a proteázok denaturálása megakadályozza a polipeptid peszticid proteolitikus elbomlását. Az organizmusok előlészének különböző módjait lehet alkalmazni anélkül, hogy szerkezetüket szétzúznánk

vagy denaturálnánk a fehérje toxint, így a kívánt peszticid aktivitása megmarad. Ezek a peszticid-kompozíciók alkalmasak kiserelésekhez való felhasználásra és növényekhez vagy növényi termékekhez való alkalmazásra.

Bár a jelen találmány bizonyos részleteit is leírtuk a szemléltetés céljából, és példákat adtunk meg a jobb megértés céljából, nyilvánvaló, hogy bizonyos változtatások és módosítások végrehajthatók a gyakorlatban, amelyek a mellékelt igénypontok oitalmi körén belül esnek.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás nyújtott hatású peszticidek előállítására, azzal jellemezve, hogy

a) a Bacillus thuringiensis törzs vagy valamely mutánsa vagy variánsa érintetlen sejtjeit kémiai reagensekkel kezeljük, vagy

b) a peszticidet Escherichia coli vagy Pseudomonas fluorescens törzsekben a Bacillus thuringiensis delta-endotoxinát kódoló heterológ gén kifejeződése útján közvetve vagy közvetlenül termeljük, és kívánt esetben kémiai reagensekkel kezeljük.

2. Az 1. igénypont szerinti a) eljárás, azzal jellemezve, hogy az NRRL B-3792 számon deponált Bacillus thuringiensis var. Kurstaki HD-1 sejtjeit alkalmazzuk.

3. Az 1. igénypont szerinti a) vagy b) eljárás, azzal jellemezve, hogy kémiai reagenseként lugol-oldatot vagy formalint használunk.

4. Az 1. igénypont szerinti b) eljárás, azzal jellemezve, hogy a peszticidet E. coli NRRL B-15976 vagy Pseudomonas fluorescens NRRL B-15977 törzsekben termeljük.

5. Nyújtott hatású, biológiai peszticid-tartalmú készítmény, azzal jellemezve, hogy hatóanyagként 0,01–95 tömeg%-ban az 1–4. igénypont szerint termelt peszticidet tartalmaz, legalább egy szokásos, szilárd vagy folyékony hordozóanyaggal együtt.

6. Eljárás lényegében érintetlen, intracelluláris peszticid toxint tartalmazó különálló E. coli vagy Pseudomonas fluorescens mikroorganizmus sejtek előállítására, azzal jellemezve, hogy a Bacillus thuringiensis delta-endotoxint kódoló heterológ gént tartalmazó E. coli vagy Pseudomonas fluorescens törzseket tenyésztjük, majd a sejteket kémiai vagy fizikai, proteáz deaktiváló vagy sejtfal-erősítő körülmények között előljük.

7. Eljárás az 1. igénypont b) eljárásában alkalmazott E. coli mikroorganizmus törzs előállítására, azzal jellemezve, hogy Escherichia coli sejtjeibe a

pSMI-17 jelű, NRRL B-15976 számon deponált, ampicillin rezisztenciát tartalmazó plazmidot építjük be, amely egy 6,8 Kbp-s HindIII DNS-fragmenst tartalmaz, amely magában foglalja a *Bacillus thuringiensis* HD-73 5' end plazmidjából származó delta-endotoxin gént.

8. Eljárás az 1. igénypont b) eljárásában alkalmazott *Pseudomonas* mikroorganizmus törzs előállítására,

5

azzal jellemezve, hogy a *Pseudomonas fluorescens* sejtjeibe a pCH2.1 jelű, NRRL B-15977 számon deponált, karbamicillin rezisztenciát adó plazmidot, amely a *Bacillus thuringiensis* HD73-ből származó delta-endotoxin gént hordozó 2,1 Kbp-s fragmenst tartalmazza a pRO1614 plazmid BamHI és SalI helyeibe ligálva, építjük be.

Kiadja: Országos Találmányi Hivatal, Budapest
Felelős kiadó: dr. Szvoboda Gabriella

KÓDEX