



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 235 785

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 28 09 82
(21) PV 6919-82

(51) Int. Cl.⁷ A 01 N 63/02

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

(75)

Autor vynálezu WEISER JAROSLAV RNDr.DrSc.,
VANĚKOVÁ JIŘINA RNDr.CSc.,
ČERNÝ MIROSLAV dr.ing.,
LAKOTA VLADIMÍR ing.CSc.,
BASTL VLADIMÍR ing., SLUŠOVICE

(54) Způsob výroby specifického mikrobiálního preparátu proti larvám komárů a muchniček

Způsob výroby specifického mikrobiálního preparátu proti larvám komárů a muchniček z krystaloforního bacila *Bacillus thuringiensis* serovar H-14 (*israelensis*) 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 vitaminů se použije v poměru 1 : 1 až 3 : 1 za přidání oligobio-
genních prvků při výchozím pH do 7,5, přičemž ukončení fermentace je při uvolnění spor a krystalů a tyto se z fermentační půdy izolují při teplotách do 80 °C za přidavku smáčedla a ochranné látky.

Předmětný vynález se vztahuje na výrobu nového bakteriálního preparátu jako vysoce selektivního biologického přípravku na hubení larev komárů a muchniček sajících krev.

Boj s komáry a muchničkami jako trapiči a přenašeči nákaz je veden ničením jejich larev v přírodních vodách. Dosud k tomu byly používány výhradně chemické insekticidy (chlorované uhlovodíky, karbanáty, organofosfáty). Postupně se vytvářela resistance komárů k těmto látkám a byly nahrazovány novými látkami často s vysokou toxicitou pro člověka a živočichy. Vyvolávaly u nich dlouhodobé onemocnění a ireparabilní poškození. Při širokých terénních aplikacích působily tyto přípravky na lovnou zvěř a živočichy ve volné přírodě a způsobily kritické snížení jejich počtu. Rezidua těchto látek se s rostlinami dostávala do potravy zvířat a vyvolávala nekontrolovatelné přemístění toxických látek i mimo místo aplikace. Přejedem do tekoucích a spodních vod se dostávaly zbytky chemických insekticidů do zásob pitné a užitkové vody a narušovaly zdraví i životní prostředí obyvatelstva.

Tyto závažné důsledky použití chemických látek proti komárům a hlavně jejich selhání při epidemích malárie, vedly k hledání přírodních účinných náhrad, které by při vysoké selektivitě nebyly prostředí cizí, nevytvářely rezidua a nepoškozovaly jiné organismy. V průběhu hledání byly izolovány nové kmeny bakterie *Bacillus thuringiensis* serovar H-7 (aizawai), serovar H-13 (pakistani) a serovar H-14 (israelensis),

kteřé jsou vysoce selektivně účinné na larvy komárů a muchniček, přenašečů nákaz a neškodné pro ostatní organismy v témže prostředí: rostliny, zvířata a člověka. Netvoří v prostředí rezidua, protože jsou součástí potravy dalších organismů a jimi jsou odstraňovány v krátké době z vodního prostředí i z půdy. Ani souvislá velkoplošné ošetření nepoškozuje ostatní organismy.

Způsob podle vynálezu umožňuje provozní výrobu specifického bakteriálního preparátu proti larvám komárů a muchniček z krystaloforního bacila *Bacillus thuringiensis* serovar. H-14 (israelensis), H-13 (pakistani), H-7 (aizawai) ekonomickým způsobem ve velkém měřítku za použití moderního zařízení a v krátkém čase 32 - 70 hod.

Vynález se týká způsobu výroby insekticidního bakteriálního preparátu proti komárům z krystalotvorného bacila druhu *Bacillus thuringiensis* serovar. israelensis, pakistani a aizawai 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 1:1 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 suší za přídavku smáčedla a ochranné látky.

Bacillus thuringiensis serovar H-14 (israelensis), serovar. H-7 (aizawai) nebo H-13 (pakistani), se kultivuje aerobně v submersních podmínkách ve sterilním tekutém mediu za stálého vzdušnění a míchání. Kultivační doba je 32 až 72 hod., optimální teplota $30 \pm 2^\circ\text{C}$, výchozí pH se může pohybovat mezi 6,5 a 7,5 s optimem při 7,0 až 7,2. Během fermentace se pH udržuje v tomto rozmezí pomocí přísady pufru, např. K_2HPO_4 nebo CaCO_3 nebo NaHCO_3 . Může být použito různých tekutých medií obsahujících asimilovatelný uhlík a dusík. Zdrojem uhlíku mohou být asimilovatelné mono-, di- nebo polysacharidy např. glukosa

maltosa, glycerol, škrob. Asimileovatelným zdrojem dusíku je bílkovinný materiál, nejlépe obsahující současně vitamíny a růstové faktory, např. kvasničný autolýzát, kvasničný extrakt, sušené kvasnice, pepton, sojová mouka, pšeničná mouka, kukuřičná mouka, mouka z odtučněných bavlíkových klíčků, kaseinový hydrolyzát, kukuřičný extrakt, výpalky po výrobě alkoholických nápojů apod. Je výhodné přidat do kultivačního media digobiogenní prvky jako hořčík, mangan, železo, zinek, vápník a sodík ve formě solí.

Po ukončení vývoje a 90-95 % vysporálování kultury bacilu, kdy se současně uvolní insekticidní krystaly, se účinná biomasa spor a inkluzí z fermentační tekutiny izoluje a suší. Před izolací se vmíchá do fermentační tekutiny s biomasou laktosa nebo chlorid sodný (5 až 30%) a smáčedlo, např. Triton X 100, Tween 20, Chevron, Slovasol ap. (5 až 10 %). Izolace sporového materiálu se provede odstředěním nebo filtrací nebo kombinací obou. Fermentační tekutinu s biomasou je možno zahustit na filmové odparce nebo odstředivkou typu Laval. Sušení je možno provést několika způsoby: proudem teplého vzduchu, lyofilizací, ve vakuové sušárně, ve sprayové sušičce, precipitací acetonem a následujícím vysušením. Materiál spor a krystalů ve formě suchého prášku si zachovává své insekticidní vlastnosti po řadu let, je-li uskladněn v suchu a chladu.

Aktivita přípravku se určuje biologickým testem na larvách komárů *Culex pipiens autogenicus* nebo *Aedes aegypti* a srovnáním s mezinárodním standardem IPS (hodnota 1000 Mezinárodních jednotek). Aktivita se vyjadřuje v Mezinárodních biologických jednotkách. Biologický test se hodnotí po 48 hod.

Příklad 1.

Živná půda na třepačce, v předočkovacím tanku a fermentačním tanku má složení: 1,3 % 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 % CaCl_2 a 0,1 % NaHCO_3 . Baňky

na třepačku na 500 ml se plní 50 ml půdy a zaočkují se 20 hod. kulturou produkčního kmene vyrostlého na šikmém ágeru o složení: agar 2,0 %, škrob 2 %, pepton 0,75 %, kvasničný autolyzát 2 %, K_2HPO_4 0,68 %, oligobiogenní prvky 0,1% základního roztoku ($MgSO_4$ 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). Kulturou z 1 šikmého agaru zaočkovány vždy 3 baňky. Předočkovací tank se očkuje 1 až 3 % objemu 12 hodinovou kulturou z třepačky, fermentor se očkuje 2-10 % objemu 20 hodin starou kulturou z předočkovacího tanku. Kultivace ve fermentačním tanku probíhá při 28 až 32°C za vzdušnění 1/2 objemem vzduchu a míchání 300 ot/min. 32-64 hodin, až dojde k uvolnění spor a krystalů z 95 % buněk kultury. Po skončení fermentace se do tekutiny v tanku s biomasou *B. thuringiensis* přimíchává laktosa (5 až 10 % počítáno na sušinu) a Slovasol (10-15%), míchá se 30 min. za současného chlazení a pak se celý objem suší na sprayové sušičce (vstup 150 - 200°C, výstup max. 80°C). Aktivita sušiny se stanoví testem na larvách *Culex pipiens autogenicus* a určí se počet jednotek aktivity preparátu.

Příklad 2.

Živná půda pro předočkovací tank a fermentor se skládá z 1,5 % pšeničné mouky, 1,0 % glukosy, 0,5 % kvasničného extraktu, 0,1 % $MgH_2PO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,3 % NaCl, 0,01 % $Fe_2(SO_4)_3$. pH upraveno na 7,0 - 7,2. Předočkovací tank se zaočkuje 1-3 % vegetativního inokula produkčního kmene starého 12 hod., vyrostlého na rotačním třepacím stroji na půdě obsahující 1 % škrobu, 0,75 % peptonu, 1,5 % kvasničného autolyzátu, 0,68 K_2HPO_4 a 0,1 % oligobiogenních prvků (viz příklad 1) a kultivuje se při 29 - 30°C za vzdušnění 1/2 objemem vzduchu a míchání 200 ot/min 20 hod. Tímto inokulem se zaočkuje fermentor se stejnou půdou. Kultivace ve fermentoru probíhá při 30°C za vzdušnění 1/2 objemem a mícháním 300 ot/min. 40 až 64 hod., až dojde k uvolnění spor a krystalů v 95 % kultury.

K biomase spor a krystalů ve fermentační tekutině se přidá 5-10% NaCl a smáčedlo Syntapon 10 %, zahustí se na filmové odparce a usuší na sprayové sušičce jako v příkladu 1. V získaném preparátu se stanoví biotestem na larvách komárů *Aedes cantans* počet jednotek aktivity.

Příklad 3.

Živná půda v přechočkovacím a fermentačním tanuku má složení 0,75 % peptonu, 0,5 % kvasničného extraktu, 1,2 % glukosy, 0,5 % KH_2PO_4 , 0,05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3 % NaCl, 0,01 % $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. Živná půda v baňkách na třepačce má složení 1,0 % glukosy, 1,0 % kvasničného autolyzátu, 0,75 % peptonu, 0,5 % K_2HPO_4 a 0,1 % oligobiogenních prvků (viz příklad 1).

Postup při inokulaci a fermentaci jsou stejné jako v příkladě 1.

Biomasa spor a krystalů ve fermentační tekutině se ochladí asi na 20°C a zahustí asi 6-krát na separátoru typu Alfa Laval. Ke koncentrátu se přidá laktosa (5 až 15 % na sušinu) a smáčedlo Triton X 100 (5 až 10 %), míchá se asi 30 min. a precipituje se 2 objemy acetonu. Precipitát se oddělí filtrací a suší se v proudu vzduchu. Aktivita se určuje biotestem na larvách komárů a srovná se s aktivitou mezinárodního standardu.

Příklad účinnosti bakteriálního preparátu na larvy L3 komára *Culex pipiens autogenicus*

konc. prep.	mortalita	
	24 hod	48 hod
0,3 mg/litr	100 %	
0,2 mg/litr	90 %	100 %
0,1 mg/litr	10 %	60 %
0,05 mg/litr	10 %	50 %
0,025 mg/litr	0 %	10 %
kontrola	-	-

Předmět vynálezu

1. Způsob výroby specifického mikrobiálního preparátu proti larvám komárů a muchniček z krystaloforního bacila *Bacillus thuringiensis* serovar H-14 (israelensis), H-13 (pakistani) a H-7 (aizawai) 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 vitaminů se použije v poměru 1:1 až 3:1 za přidání oligobiogenních prvků při výchozím pH do 7,5, přičemž ukončení fermentace je při uvolnění spor a krystalů a tyto se z fermentační půdy izolují a po přidávku smáčedla 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.