

276793



P.- 22.707  
A 62.989  
BL. U.S. 107.014/107.013  
AMS/ICB

276793

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

formulada el 26 de Abril de 1962, con el Nº 276.793

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de ROHM & HAAS COMPANY, entidad norteamericana, establecida en 222 West Washington Square, Filadelfia, Pensilvania, Estados Unidos de América.

por:

" MEJORAS INTRODUCIDAS EN LA PREPARACION  
DE COMPOSICIONES PESTICIDAS "

-----  
Este invento se refiere a composiciones tóxicas para las plagas.- Se refiere también a procedimientos para preparar composiciones tóxicas para las plagas.- De modo específico, se ocupa de composiciones que comprenden elementos obtenidos a partir de un microorganismo y que son tóxicas para las plagas.- Además, el invento se refiere a procedimientos para obtener composiciones que comprenden elementos obtenidos a partir de un microorganismo y que son tóxicas para las plagas.

10



La idea de emplear microorganismos para la destrucción de los insectos nocivos se ha venido estudiando desde hace bastantes años.- Más recientemente, se han publicado varios artículos sobre este asunto.- Steinhaus, en la revista Agricultural and Food Chemistry, vol. 4. nº 8 (1956), ha señalado las posibilidades que ofrece el control microbiano de los insectos.- El microorganismo que se ha empleado más corrientemente ha sido Bacillus thuringiensis, aislado por E. Berliner (Ztschr.f.das Ges. Getreidewesen, 3, 63-70, 1911).- Según Berliner, es un bastón móvil, gram-positivo, formador de esporas.- Durante la esporulación, -- las células del microorganismo contienen una espora en una extremidad y, en la otra, un cristal romboédrico o cuerpo de inclusión asporal (C.L.Hannay y P.Fitz-James, Can. J. Microbiol. Vol. 1, pp.694-710, 1955). Rab. y col. en Journal Economic Entomology, 50, nº 3 (1957), "Ensayos preliminares usando Bacillus thuringiensis -- Berliner contra "gusanos astados", han completado los hallazgos anteriores en este sector.- Artículos publicados en Nature, 173, pp.545-546 (1954), y en Canadian Journal of Microbiology, 2, pp. 111-121 (1956), y otros, publicados por Edward A Steinhaus y otros en Hilgardia, revista sobre ciencia agrícola publicada por la Estación Experimental Agrícola de California, señalan que hay otras bacterias formadoras de esporas que son patógenas para los insectos.

Los mencionados Bacilos que producen elementos tóxicos para las plagas se encuentran fácilmente asequibles en depósitos reconocidos, tal como en la

276793



Estación Experimental de California, Berkeley, California, la American Type Culture Collection, Washington, D C. (Bacillus thuringiensis ATCC 10792), y el Higher Education and Science Bureau of the Ministry of Education, Tokyo, Japón, (Bacillus sotto, Japanese Collection, No 117C).

A pesar de este sostenido interés por el desarrollo de un plaguicida microbiano práctico y efectivo, el progreso significativo hacia el logro de un tal producto ha estado obstaculizado por problemas molestos.- Algunos de éstos se refieren al producto microbiano mismo; uno de sus inconvenientes más serios se ha atribuido a su espectro de eficacia demasiado estrecho frente a sólo una especie de insectos en casos en que se quieren exterminar varios tipos de plagas nocivas (Agricultural and Food Chemistry 4, No 8, 677 (1956).- Se ha presentado otros problemas serios en el desarrollo de un método práctico para cultivar un bacilo formador de esporas que sea patógeno para insectos y para obtener un plaguicida microbiano efectivo.- Los investigadores han tenido que enfrentarse con fermentaciones demasiado largas, con una formación inadecuada o excesivamente lenta de esporas y/o de cristales de inclusión, germinación prematura de los esporas y dificultades en la separación de los bacilos del medio.- Recientemente, se ha publicado un intento de superar algunas de estas dificultades, en 12 de Octubre de 1960, como patente francesa nº 1,233,208, concedida a Megna, de Bioferm Corporation.- La solución intentada por Megna para el desarrollo de Bacillus thuringiensis.

276793



o Bacillus sotto esporógenos es el uso de un medio de fermentación que contiene un suministro limitado de --  
carbohidratos fermentables y nitrógeno asimilable para el desarrollo del bacilo bajo condiciones aeróbicas su  
5 mergidas.- El suministro de estos dos nutrientes es -  
tal que se agota en una diferencia de tiempo no mayor\_  
de 6 horas y, preferiblemente, al mismo tiempo, aproxi-  
madamente, después del comienzo de la esporulación.- \_  
El objetivo general del procedimiento descrito es ago-  
10 tar primero y, por tanto, limitar el suministro de los  
dos nutrientes dentro de la diferencia de tiempo espe-  
cificada, sometiendo así a las células a una forma de\_  
"depauperación" limitada, y luego recoger las células,  
por ejemplo por filtración, y tirar el filtrado, el me-  
15 dio líquido agotado.- Es decir, usando esencialmente\_  
una manera conocida de depauperación limitada del mi-  
cro-organismo (Journal of Applied Bacteriology, Vol.20,  
nº 3, pp 315-324 (1957)), induciendo así la formación\_  
de cuerpos de inclusión y esporas y reduciendo al míni-  
20 mo la germinación de éstas últimas.- Además, la paten-  
te de Megna advierte contra el uso de un desequilibrio  
en el suministro del carbohidrato fermentable y nitró-  
geno asimilable a causa de las dificultades resultan-\_  
tes: esporulación incompleta, división indeseable de -  
25 células, liberación de esporas y cristales de inclu-\_  
sión, germinación de esporas, células viables aminora-  
das, y mayores dificultades en la separación de las es-  
poras del medio.- Esta separación se realiza, según -  
se explica en la patente y en un artículo de Chemical\_  
30 Engineering, de 3 de Octubre de 1960, pp. 42-44, "Un



montaje de tanque que produce el primer insecticida con  
tra las chinches", por filtración después de fermenta-  
ción para obtener las esporas secas y tirando el caldo  
agotado.- Además de la limitación impuesta sobre el \_  
5 suministro relativo de nutrientes, el procedimiento de  
Megna utiliza también un medio en el que el suministro  
total de nutrientes está limitado a 3 ó 4 por ciento.-  
En estas condiciones, sólo se obtiene un máximo -  
de  $5 \times 10^{-9}$  células bacterianas por ml.

10 Otro intento reciente para resolver estas  
dificultades relacionadas con el desarrollo de un pla-  
guicida microbiano efectivo se ha publicado como paten-  
te francesa nº 1.225.179, concedida al Instituto Pas-  
teur.- La patente francesa nº 1.247.677, de Farboerke  
15 Hoechst, trata de un procedimiento para secar esporas\_  
húmedas de Bacillus thuringiensis, después de separar\_  
el caldo de fermentación agotado, con sulfato sódico -  
anhidro.

El presente invento proporciona nuevas -  
20 composiciones que comprenden elementos tóxicos para --  
las plagas.- Estos elementos tóxicos son producidos \_  
por un microorganismo tal como una bacteria.- En una\_  
realización del invento, los elementos tóxicos pueden\_  
obtenerse a partir de un Bacillus.- En un aspecto no-  
25 table, los elementos tóxicos se obtienen a partir de -  
un Bacillus formador de cuerpo de inclusión.- El in-\_  
vento proporciona también una composición que compren-  
de cuerpos de inclusión de un Bacillus formador de --  
cuerpo de inclusión, una composición que comprende espo-  
30 ras de un Bacillus formador de cuerpo de inclusión; y \_

270153



además, otra composición valiosa es la que comprende -  
las toxinas acuosolubles de un Bacillus formador de --  
cuerpo de inclusión.- Otra realización proporciona --  
composiciones que comprenden esporas, cuerpos de inclu-  
5 sión y toxinas acuosolubles de un Bacillus formador de  
cuerpo de inclusión en proporciones variadas de cada -  
uno de estos elementos.- Una propiedad valiosa de tal  
composición es su amplio espectro de toxicidad sobre -  
varias plagas nocivas, siendo dicha composición letal  
10 no solamente sobre insectos representados por las oru-  
gas de marismas (Estigmene acrea) sino también sobre -  
insectos de los que es típico el gusano "del ejército -  
del sur" (Prodenia eridania) y las larvas de la mosca  
casera corriente (Musca domestica).

15 Este invento proporciona también una com-  
posición que comprende cuerpos de inclusión y esporas  
de un Bacillus formador de cuerpo de inclusión; una --  
composición que comprende esporas y cuerpos de inclu-  
sión de un Bacillus formador de cuerpo de inclusión, y  
20 una composición que comprende esporas de un Bacillus -  
formador de cuerpo de inclusión las toxinas acuosolu-  
bles de un microorganismo productor de toxinas; y una  
composición que comprende cuerpos de inclusión de un -  
Bacillus formador de cuerpo de inclusión y las toxinas  
25 acuosolubles de un microorganismo productor de toxinas,  
tal como un Bacillus.- Estas composiciones se propor-  
cionan en varias formas, tal como líquidos o sólidos.-  
Composiciones muy valiosas, a condición de que las es-  
poras y/o los cuerpos de inclusión sean liberados de -  
30 las células del microorganismo en que estuvieron conte-

976703



nidas anteriormente.- Las composiciones del invento  
son notables por su efecto letal, algunas veces comple  
tamente específico, sobre varias plagas nocivas.

Se proporciona también un procedimiento -  
5 que comprende desarrollar un microorganismo que produ  
ce una sustancia tóxica para las plagas bajo condicio  
nes sumergidas aeróbicas, en un medio que comprende --  
carbohidrato asimilable y nitrógeno asimilable.- Igual  
mente, se proporciona un procedimiento que comprende -  
10 desarrollar un Bacillus formador de cuerpo de inclusión,  
bajo condiciones sumergidas, aeróbicas, en un medio que  
comprende carbohidrato asimilable y nitrógeno asimila  
ble.- En un aspecto del procedimiento, se obtiene una  
población microbiana de más de  $5 \times 10^9$  microorganismos  
15 por mililitro, preferiblemente más de  $9 \times 10^9$ , y  
generalmente por lo menos  $10 \times 10^9$  bacilos por milili  
tro, habiendo desarrollado las bacterias más de 90%, -  
usualmente más de 95%, una espora y un cuerpo de inclu  
sión.- En otro aspecto, se proporciona un procedimien  
20 to por el cual la mayoría de las células del bacilo, y  
preferiblemente más del 95%, han liberado tanto las es  
poras como los cuerpos de inclusión.- De acuerdo con  
un aspecto preferido del procedimiento, el medio de de  
sarrollo comprende por lo menos 8%, y preferiblemente  
25 por lo menos 10%, de sólidos totales nutrientes.- Otra  
realización comprende separar los elementos tóxicos --  
del medio de desarrollo agotado.- Otra realización --  
adicional comprende mezclar dos o más de los elementos  
tóxicos para dar composiciones útiles para combatir --  
30 las plagas.



Todo microorganismo que produzca una sustancia tóxica para las plagas puede desarrollarse de acuerdo con este procedimiento, con ajustes adecuados, según se desee, para adaptar el microorganismo particular seleccionado.- Los microorganismos preferidos son bacterias, especialmente del tipo Bacillus.- Entre las bacterias (tipo cocos o bastones) que pueden usarse de acuerdo con el invento, pueden citarse las siguientes:

- 10                    Bacillus alvei,  
                      Bacillus larvae,  
                      Bacillus finitimus,  
                      Bacillus laterosporus,  
                      Bacillus pulvifaciens,  
15                    Bacillus lentimorbus,  
                      Bacillus popilliae,  
                      Bacillus ephestiae,  
                      Bacillus sphaericus,  
                      Bacillus rotans,  
20                    Bacillus bombyces,  
                      Bacillus entomocidus,  
                      Bacillus thuringiensis,  
                      Bacillus thuringiensis gelechia,  
                      Bacillus thuringiensis Cazaubon,  
25                    Bacillus thuringiensis Berliner,  
                      Bacillus thuringiensis galleriae,  
                      Bacillus thuringiensis anduze,  
                      Bacillus entomocidus subtoxius,  
                      Bacillus sotto,  
30                    Bacillus pyrenei,



Bacillus dentrolimus talalor,

Bacillus ureus,

Bacillus laterospours,

Bacterium entomotoxicon,

5                   Aerobacter aerogenes, Escherichia coli,  
                    Serratia marcescens,

Dentro del contexto del invento, el término "microorga-  
nismo que produce una sustancia tóxica para las plagas"  
abarca el término "microorganismo patógeno".- Por tan-  
10 to, el lugar o el tiempo en que el microorganismo pro-  
duce la toxina letal para la plaga carece de importan-  
cia; puede ser durante el desarrollo del microbio y/o  
posteriormente durante el contacto de la composición  
microbiana con la plaga; y pueden intervenir una o varias  
15 toxinas.

De acuerdo con el procedimiento para el -  
desarrollo del microorganismo productor de sustancia -  
tóxica, tal como un bacillus, se emplea un medio nu-  
triente acuoso que comprende una fuente utilizable de  
20 energía, carbono asimilable y nitrógeno.

Toda sustancia que pueda ser oxidada y/o  
fermentada puede ser una fuente conveniente de energía.  
Una fuente preferida es un material carbohidrato.- --  
Ejemplos de tales carbo hidratos comprenden azúcares, ta  
25 les como glucosa, levulosa, maltosa, manosa, sacarosa,  
lactosa, arabinosa, galactosa, dextrina, almidón y xi-  
losa en formas de producto bruto o purificada, solos y/  
o en mezcla; los llamados almidones y dextrinas solu-  
bles y otras sustancias carbohidrato total o parcial-  
30 mente solubles en agua.- Entre otros materiales oxida



bles se incluyen grasas, gliceroles, glicoles, y com-  
puestos que contienen nitrógeno, tal como proteínas, -  
que pueden servir a la vez como fuentes de carbono y -  
de energía.- Es conveniente emplear como fuente de --  
5 carbohidrato un subproducto de varios procedimientos,-  
tal como suero, melazas, licor de maceración del maiz,  
o licor sulfítico residual.- Como fuente de nitrógeno,  
puede emplearse corrientemente un material proteínico\_  
complejo, tal como harina de soja, extracto de levadu-  
10 ra, caseína hidrolizada, suero y suero en polvo, leche  
para mantequilla, harinas de semilla de algodón, hari-  
na de avena, peptona, aminoácidos, solubles de pescado  
condensados, extracto de carne, y otras sustancias ni-  
trogenadas análogas de origen vegetal o animal.- Cuan-  
15 do se desee, pueden emplearse fuentes inorgánicas de -  
nitrógeno, solas o en unión de las descritas arriba.--  
Como ejemplos típicos están los nitratos, sales amóni-  
cas, y sales minerales, tal como cloruro sódico, cloru-  
ro potásico, y sulfato magnésico.- Además pueden pro-  
20 porcionarse elementos traza, si se desea, tal como hie-  
rro, cobre, cobalto, azufre, manganeso, molibdeno, cal-  
cio, y aluminio.- La temperatura debe ser tal que fa-  
vorezca el desarrollo durante la fase de crecimiento -  
del microorganismo, generalmente entre 15 y 40º C. o -  
25 mayor o menor.

Para favorecer el crecimiento y desarro-  
llo óptimo de esporas y/o toxinas, es conveniente pro-  
porcionar aireación al medio de cultivo.- La aireación  
-debe ser preferiblemente adecuada para sostener las -  
30 exigencias metabólicas de oxígeno del microorganismo y



preferiblemente el medio debe estar también libre de -  
subproductos metabólicos indeseables.- Para lograr és  
to, puede proporcionarse aire estéril, a la velocidad\_  
de 0,25 a 1,0 volúmenes por volumen de medio por minu-  
5 to.- También se proporciona una velocidad satisfactoria  
mediante un suministro de aire cargado a una velocidad  
que procure que se utilice no más de 40% del oxígeno -  
por el bacilo o que el aire efluyente tenga un conteni\_  
do de no más de aproximadamente 10% de dióxido de car-  
10 bono.- Preferiblemente, se proporcionan también agita\_  
ción mecánica para aumentar la aireación del cultivo -  
sumergido.- Si se desea, pueden proporcionarse compo-  
siciones antiespuma para reducir al mínimo la formación  
de espuma.- Son típicas de estas composiciones; ácido  
15 láurico, alcohol oleílico, ácido oléico, siliconas, --  
aceite de manteca de cerdo, parafina líquida, etc.- Si  
se desea, pueden emplearse también agentes humectantes  
y dispersantes.- Pueden mencionarse, como convenientes  
para este fin, sulfonatos de alcarilo, alcoholfenoxipo-  
20 lietoxietanoles, sulfonatos de lignina, y naftaleno-  
formaldehído sulfonatos condensados.

Cuando se desea desarrollar un bacillus, -  
puede emplearse el siguiente método; El inóculo vegeta\_  
tivo, que se usa para inoculación de los fermentadores,  
25 se obtiene generalmente proporcionando un iniciador --  
que se lleva por medio de dos o más pasos a un medio \_  
líquido apropiado. Un procedimiento conveniente con-  
siste en inocular un matraz Erlenmeyer de 500 ml. con\_  
un cultivo del bacilo deseado, tal como Bacillus thu-  
30 ringiensis, Bacillus entomocidus o Bacillus sotto, -



desarrollando sobre la superficie de un tubo inclinado de agar-agar.- El matraz Erlenmeyer se incuba a unos 30<sup>o</sup> C. bajo condiciones aeróbicas intensas que pueden proporcionarse, por ejemplo, colocando los matraces en un agitador rotatorio.- A las 24 horas después, se inocula un matraz de 1 litro que contenga 125 ml. de un medio líquido apropiado, con el medio procedente del matraz Erlenmeyer.- Este matraz de 1 litro se incuba otra vez durante 24 horas a 30<sup>o</sup>C, con agitación energética y puede luego emplearse para inocular un medio nutritivo adecuado en cualquier fermentador conveniente. Un medio adecuado comprende los siguientes ingredientes en una cantidad que puede ajustarse para adaptarse a los rendimientos óptimos dentro de los límites especificados.- Preferiblemente, el medio se esteriliza antes de inoculación con el bacilo.

Caseina	1.0-3.65%
Agua de maceración del maíz	1.0-5.0%
Almidón	0-9.2%
Sacarosa	0.6-3.5%
Melazas de fermentación	0-9.2%
Levadura seca	0.5-0.8%
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.42-0.60%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17-0.24%

Durante la fermentación, es preferible que el medio tenga un pH entre 5 y 8, mejor todavía entre 6,5 y 7,5.- Generalmente, puede ajustarse al pH deseado mediante adición de una base adecuada, tal como hidróxido sódico, hidróxido



potásico, amoniaco, etc. La marcha del desarrollo del bacilo puede seguirse por examen al microscopio de muestras del medio de cultivo.

5 En el procedimiento del invento, el crecimiento y el desarrollo del bacilo sigue un curso que puede dividirse en varias etapas, que generalmente se superponen hasta cierto punto.- A medida que transcurre el desarrollo del bacilo, se alcanza un recuento máximo de células vegetativas, seguido por un máximo en la esporulación.- Durante la esporulación y/o después de la misma, pueden producirse toxinas.- Entonces se para el proceso.- Preferiblemente, se continúa hasta una tercera etapa, durante la cual las paredes de las células bacterianas se desintegran dejando en libertad esporas y cuerpos de inclusión asporales.

10

15

De acuerdo con el procedimiento, puede continuarse el desarrollo del bacilo hasta que se alcanza el recuento celular vegetativo deseado, acompañado, preferiblemente, por una esporulación de, por lo menos, 90% de la población bacteriana.- Una realización notable comprende desarrollar el bacilo para dar un recuento celular máximo de más de  $5 \times 10^9$  por mililitro y preferiblemente de más de  $7 \times 10^9$ , siendo especialmente conveniente más de  $10 \times 10^9$  bacilos por mililitro.- Lo mejor de todo, es que esto sea simultáneo de una esporulación de, por lo menos, 90% y preferiblemente por lo menos de 95% de la población bacteriana.

20

25

Un aspecto favorecido del procedimiento comprende desarrollar un Bacillus para alcanzar un recuento celular vegetativo máximo durante un lapso de -

30



20 a 30 horas, preferiblemente 24 a 26 horas, seguido de un recuento de esporulación máximo durante un lapso de tiempo adicional de 20 a 30 horas, preferiblemente 24 a 28 horas, y parar el proceso después de un tiempo adicional de 4 a 8 horas.- Esta combinación de condiciones parece que es extraordinariamente favorable para favorecer el desarrollo excelente de esporas, cuerpos de inclusión, y otras toxinas.- Cuando, en combinación con estas condiciones, se desarrolla el Bacillus para dar un recuento celular de más de  $8 \times 10^9$  por mililitro, hay un mejoramiento adicional de propiedades convenientes y útiles en la composición microbiana plaguicida.

Como refinamiento complementario del procedimiento, que puede usarse con o sin sus realizaciones preferidas, el medio empleado para desarrollar el bacilo puede contener por lo menos, 6%, o mejor 8%, de sólidos nutrientes totales, siendo el 10%, por lo menos, de nutrientes totales un nivel muy conveniente.-- A diferencia de lo que sucede con las técnicas corrientes que hasta ahora se han venido utilizando, que parece que restringen la absorción de nutriente del bacilo, el presente medio parece que favorece el desarrollo de las propiedades deseadas en el bacilo y en las composiciones plaguicidas finales.- Cuando algunas de estas características, o todas, descritas se realizan con un medio, de un volumen total de por lo menos 3 litros y preferiblemente 6 litros, parece que se asegura aun más un desarrollo excelente, esporulación y desarrollo de cuerpos de inclusión y otras toxinas.



En una realización adicional del invento,  
las esporas, los cuerpos de inclusión y las toxinas acuo  
solubles del Bacillus se separan, individualmente o una  
o más juntas, del medio acuoso agotado.- Si se desea,  
5 pueden volver a mezclarse estos elementos, y esto pue-  
de hacerse para incrementar o disminuir su proporción\_  
respectiva hasta cualquier grado deseado para obtener como  
posiciones que tengan concentraciones diversas de es\_  
tos elementos.

10 El procedimiento para separar los divers  
os elementos del medio acuoso agotado incluye el aument  
tar la concentración de estos elementos arriba mencion  
ados hasta cualquier nivel que se desee, incluyendo -  
hasta el grado a que se obtiene producto seco.- En el  
15 contexto del invento, el término "incrementar la cono  
centración" se usa en su sentido más amplio posible par  
a definir la disminución de la proporción de agua con  
respecto a los elementos no acuosos, independientemente  
de que estos elementos sean o no solubles en agua.-  
20 En este término se incluyen el secado por congelación\_  
de la composición líquida y las técnicas equivalentes\_  
en las que se forman cristales de hielo y se vaporizan.  
Si se desea, la composición puede conservarse congelada.

El aumento de la concentración de los cuero  
25 pos asporales insolubles en agua de las toxinas acuoso  
lubles, y de las esporas, puede lograrse eliminando el  
agua del licor de fermentación.- Esto puede conseguirs  
se en cualquier momento cuando la concentración de es-  
poras, cuerpos de inclusión o toxinas acuosolubles ha\_  
30 alcanzado el nivel deseado.- La concentración puede -

273793



lograrse de varias maneras.- Un procedimiento consiste en vaporizar el agua del medio de desarrollo hasta que se ha obtenido el grado deseado de deshidratación del producto.- Esto puede conseguirse por concentración, evaporación, por ejemplo, calentando, preferiblemente en vacío, secando, secando por atomizado, o secando por congelación, el medio de cultivo o por cualquier combinación de estos métodos o de otros equivalentes.

Otra manera de separar los ingredientes -  
deseados comprende eliminar los elementos insolubles -  
en agua que comprenden las esporas, cuerpos de inclusión  
asporales y otros elementos insolubles en agua, tal como células bacterianas y residuos, del medio de desarrollo, separando después los elementos acuosolubles -  
de la fase acuosa.- Si se desea, puede incrementarse la  
concentración de los elementos tóxicos acuosolubles en  
la fase acuosa hasta cualquier grado que se quiera, y  
luego, si se desea, se vuelven a combinar los elementos  
insolubles y los elementos acuosolubles.- Un procedimiento por el cual puede lograrse esto, es por filtración del medio agotado, recogiendo así esporas, inclusiones asporales, y otros insolubles, y tratando el filtrado que contiene los elementos acuosolubles con un material absorbente, con un floculante o con un precipitante que separa los acuosolubles que contienen toxinas acuosolubles del agua.- El material separador puede ser orgánico y/o inorgánico; puede combinarse físicamente y/o químicamente con las toxinas acuosolubles. Por ejemplo, puede convertir las toxinas acuosolubles, que pueden estar en la forma de sus sales acuosolubles,

276703



en sus sales insolubles en agua.- Puede usarse un material absorbente tal como carbones activados, cáscara de nuez de coco, carbón vegetal decolorante, alúmina, arcillas, bentonitas, tierras de batán, geles de sílice, zeolita, resinas de cambio iónico, tal como resinas de cambio aniónico, y materiales análogos.- O bien, puede usarse un precipitante para formar sales insolubles en agua tal como las de los metales alcalino-térreos, de magnesio, calcio, bario, y análogos.- Estas pueden emplearse en forma de cloruro, sulfato, sulfitos, fosfato, aluminatos, amoníaco, carbonato, citrato, y análogos: también pueden emplearse sales mixtas.- Alternativamente, la separación de las toxinas acuosolubles puede hacerse en un medio en el que están presentes los elementos insolubles en agua.

En el método de separación de las toxinas acuosolubles del medio acuoso, es conveniente, en general, llevar el pH del medio dentro de los límites óptimos para causar una separación, por ejemplo, por absorción, floculación, precipitación o manera análoga.- El ajuste del pH puede hacerse antes, durante o después del tratamiento con el material separador.- Los límites óptimos de pH para la separación pueden variar mucho, dependiendo, entre otros varios factores, del nutriente particular y otros ingredientes del medio, su pH, la naturaleza del agente separador empleado, ya -- que, además, puede influir en el pH, y los otros factores, tal como la temperatura.- En general, un pH dentro de los límites de 3,5 a 7,5 da resultados satisfactorios. Los ajustes del pH pueden lograrse por medio de materia

276793



les alcalinos, tal como hidróxidos, carbonatos, etc. de los metales alcalinos, tal como sodio, potasio, y - análogos, o ácidos, como los ácidos minerales u orgá- nicos o sus sales.

5                   La cantidad de agente separador no es crí- tica, dependiendo la cantidad óptima del tipo de agen- te de separación, de su eficacia, y de otros factores\_ evidentes para los expertos en esta técnica.- Por ejem- plo, el agente separador puede regenerarse y usarse de  
10 nuevo varias veces como en el caso de una resina de -- cambio iónico, hasta que se ha retirado del medio nu- triente la cantidad deseada de solubles de toxina.

Todos los productos obtenidos del medio - acuoso pueden usarse como tales o pueden tratarse des- pués, por ejemplo, por secado, por secado rotatorio, -  
15 secado en bandeja, o secado por atomización.- Los pro- ductos líquidos brutos pueden centrifugarse y secar la torta resultante, o puede filtrarse el producto bruto\_ y luego puede secarse la torta de filtración.

20                   De acuerdo con otra realización, se pro- porciona un método para la separación de las esporas\_ de un Bacillus formador de cuerpo de inclusión de los\_ cuerpos de inclusión y las toxinas acuosolubles de un\_ Bacillus formador de cuerpo de inclusión.- El método\_  
25 comprende separar las toxinas acuosolubles del Bacillus, por ejemplo, por filtración, obteniendo así los cuer- pos de inclusión y las esporas del Bacillus, tratando\_ este elemento insoluble en agua con álcali acuoso, por ejemplo, con una solución que tenga un pH de 9,0, por\_  
30 lo menos, de un metal alcalino, tal como hidróxido só-

2700



dico o potasico, y filtrar el producto, formando así -  
una composición que comprende esporas del Bacillus esen-  
cialmente libres de cuerpos de inclusión y toxinas acu-  
solubles del Bacillus.

5                   Se proporciona también un método para la  
separación de los cuerpos de inclusión de un Bacillus  
que comprende separar las toxinas acuosolubles del Ba-  
cillus, obteniendo de este modo una composición que com-  
prende esporas y cuerpos de inclusión del Bacillus, --  
10 germinando las esporas del mismo, para dar las células  
vegetativas y separar estas últimas, dando así una com-  
posición que comprende los cuerpos de inclusión de un  
Bacillus que está esencialmente libre de sus esporas.-  
La germinación de las esporas puede hacerse en un medio  
15 nutriente que comprenda carbohidrato asimilable, tal -  
como una solución de melazas, sacarosa, glucosa, etc.-  
o puede usarse el medio usado para desarrollar el Baci-  
llus, - La mezcla de células vegetativas y cuerpos de  
inclusión, con esporas residuales, si las hay, se tra-  
20 ta con un disolvente inmiscible con agua que favorece  
la separación de las células vegetativas.- Para este  
fin son útiles los hidrocarburos halogenados, tal como  
fluorometanos, fluoroclorometanos y análogos.- Este -  
proceso de germinación y separación de células vegeta-  
25 les puede repetirse, si se desea, hasta que el produc-  
to esté esencialmente libre de esporas.

De esta manera pueden obtenerse composi-  
ciones que comprenden cada uno de los tres elementos -  
y esporas, cuerpos de inclusión y toxinas acuosolubles  
30 de Bacillus libres de cualquiera de los otros elementos,



o de los dos.- Los elementos individuales de que se ha  
tratado arriba pueden mezclarse de nuevo en cualquier  
combinación que se desee para dar composiciones que --  
comprenden dos o más de la totalidad de los elementos  
5 en cualquier proporción deseada.- Si se quiere, pueden  
prepararse composiciones mixtas en las que uno o más -  
de los elementos arriba descritos deriva de un microor-  
ganismo diferente, hongo o bacilo.- Por ejemplo una -  
composición puede comprender las toxinas acuosolubles\_  
10 de Bacillus entomocidus, las esporas de Bacillus thu-  
ringiensis, y los cuerpos de inclusión de Bacillus so-  
tto.- Análogamente, las toxinas acuosolubles pueden -  
ser proporcionadas por un microorganismo patógeno, un\_  
hongo o un bacilo, mientras que las esporas y cuerpos\_  
15 de inclusión pueden ser proporcionadas por el mismo o\_  
por diferente Bacillus.- Además, las toxinas acuosu-  
bles no necesitan desarrollarse por un microorganismo\_  
sino que pueden ser proporcionadas por síntesis química.

En las composiciones que comprenden espo-  
20 ras y cuerpos de inclusión de un Bacillus, su número se  
rá generalmente sustancialmente igual, es decir, estará  
en una proporción relativa de 1:1, pero, como se ha des-  
crito arriba, las diversas composiciones pueden mezclar-  
se para dar composiciones en las que los cuerpos de in-  
25 clusión predominen sobre las esporas o viceversa, es de-  
cir, en una relación de 2:1 o 10.000:1, o en cualquier\_  
rango intermedio.

En las composiciones que comprendan espo-  
ras del Bacillus, son generalmente viables, es decir, -  
30 son capaces de germinar en condiciones adecuadas.- No\_



obstante, las esporas pueden estar también en un estado no viable, es decir, no se desarrollarán ya más, o pueden estar en un estado latente o aparentemente no viable.

5                    En las composiciones del invento, el número de esporas es preferiblemente mayor de  $15 \times 10^9$  y especialmente mayor de  $30 \times 10^9$  por gramo.- Se preparan composiciones muy valiosas que acusan un número de esporas por lo menos de  $60 \times 10^9$  por gramo.- En las composiciones, las esporas y/o los cuerpos de inclusión pueden estar liberados de las células del Bacillus que anteriormente las contenía, por haber sido autolizadas las células del Bacillus.- Así, pues, cuando se liberan de este modo las esporas y/o los cuerpos de inclusión, las composiciones presentan ventajas especiales. Cuando las composiciones comprenden cuerpos de inclusión, esporas y toxinas acuosolubles, se caracterizan por un espectro particular de toxicidad sobre plagas nocivas.- Son tóxicas para insectos del tipo de las orugas de las marismas, gusanos del ejército del sur, y las larvas de la mosca común.- Preferiblemente, la composición tiene el espectro de toxicidad siguiente:

	<u>DL<sub>50</sub></u>	
	CONCENTRACION (máximo)	CONCENTRACION (preferida)
25		
Orugas de marismas	300 ppm.	100-20 ppm.
Gusanos del ejército del sur	7500 ppm.	2400-1000 ppm.
Larvas de mosca	900 ppm.	300-50 ppm.

30    Composiciones en las que falta uno o más de los elemen



tos tóxicos, esporas, cuerpos de inclusión o toxinas -  
acuosolubles, presentan una toxicidad más específica.-  
Entre tales composiciones están las que comprenden --  
las toxinas acuosolubles que son tóxicas para los in-  
sectos del tipo de los gusanos del ejército del sur, y  
la ausencia de cualquier material tóxico para insectos,  
del tipo de las orugas de las marismas.- Son composi-  
ciones preferidas las que tienen  $DL_{50}$  con un máximo de  
7500 ppm. preferiblemente un máximo de 1500 ppm, y es-  
pecialmente 1000 ppm., de este material.

Las composiciones del invento se propor-  
cionan en forma sólida o líquida; también pueden tomar  
cualquier consistencia intermedia.

Las composiciones líquidas pueden ser el  
medio de fermentación del invento que contiene activi-  
dad plaguicida conveniente mínima.- Generalmente, es  
preferible que la composición líquida comprenda más de  
 $5 \times 10^9$ , preferiblemente por lo menos  $10 \times 10^9$ , y más  
específicamente por lo menos  $15 \times 10^9$ , de esporas por  
mililitro con o sin cuerpos de inclusión.- Cuando, --  
concomitantemente con este número de esporas, la mayo-  
ría de células bacterianas está en estado autolizado,-  
la composición presenta una actividad plaguicida aumen-  
tada.- Preferiblemente, se autolizan por lo menos 90%  
de las células, habiendo pues liberado sus esporas y -  
sus cuerpos de inclusión.- Si se desea, la autólisis  
de las células para liberar las esporas, los cuerpos de  
inclusión y cualquier otro ingrediente endocelular pue-  
de favorecerse mediante el uso de agentes autolizantes,  
químicos o bioquímicos, por ejemplo enzimas.- Estos pue-



den usarse en el medio de fermentación a medida que se desarrolla el bacilo o sobre el medio de fermentación final.

5 Cuando las composiciones líquidas comprenden esporas, cuerpos de inclusión y toxinas acuosolubles, tienen preferiblemente la siguiente toxicidad mínima:

10 Una  $DL_{50}$  sobre gusanos del ejército del sur con un máximo de 25.000 ppm., una  $DL_{50}$  sobre orugas de las marismas con un máximo de 1.000 ppm. y una  $DL_{50}$  sobre larvas de mosca con un máximo de 3.000 ppm.- Más preferiblemente, los máximos son 5.000, ppm., 200 ppm., y 600 ppm., respectivamente.- Cuando las composiciones comprenden las toxinas acuosolubles, pueden considerarse típicas para una toxicidad mínima de una  $DL_{50}$  sobre gusanos del ejército del sur con no más de 50.000 ppm.- del material.- Cuando la composición comprende a la vez las toxinas acuosolubles y esporas y/o cuerpos de inclusión, sus toxicidades mínimas puede considerarse típicas para una  $DL_{50}$  sobre gusanos del ejército del sur con no más de 50.000 ppm. y una  $DL_{50}$  sobre orugas de las marismas con no más de 2.000 ppm. del material.- Las composiciones más preferidas tienen niveles de toxicidad mayores.

25 La composición líquida del invento puede concentrarse hasta el grado que se desee hasta que, si se desea, se obtiene una composición sólida.- El grado de concentración a que se llegue depende de muchos factores entre los que figuran la naturaleza del medio de desarrollo, y la amplitud de desarrollo del bacilo.- En

30



general, concentrando entre los límites de 2 a 4 veces,  
y preferiblemente de 3 a 4 veces, se obtiene un producto  
satisfactorio.- Como regla general, el plaguicida\_  
microbiano líquido tiene un contenido no mayor de 40%  
5 de sólidos, preferiblemente de 25 a 35% de concentraci  
ción de sólidos.- Como es natural, cuando una viscosidad  
elevada no constituye un inconveniente, o cuando\_  
está compensada mediante rebajadores de viscosidad, la  
concentración puede llevarse hasta un grado intermedio  
10 o hasta dar el producto seco.- Si se desea, pueden agreg  
arse al líquido un inhibidor de contaminación fúngica y/  
o contaminación bacteriana.- Puede emplearse cualquier  
plaguicida, tal como un fungicida o un bactericida, --  
que sea compatible con el producto microbiano.- Igual  
15 mente, pueden emplearse estabilizadores.- Pueden cita  
tarse como típicas las sales de metales alcalinos y meta  
les alcalino térreos, tal como potasio, sodio, calci  
o, magnesio y otros, tales como manganeso, hierro, -  
cobre, aluminio, cobalto y níquel.- Estas pueden usar  
20 se en cualquier forma que se desee, por ejemplo, sulfato  
fosfato y cloruro, o análogas.- La cantidad de inhi  
bidor puede ser entre 0,5 y 20%, preferiblemente entre  
5 y 10%, y debe ser tal que, al mismo tiempo que -  
consigue la inhibición en la composición líquida, no -  
25 ejerza ningún efecto inconveniente sobre la actividad\_  
plaguicida de la composición microbiana al diluir en -  
el momento de su uso.

Las composiciones del invento pueden usar  
se en cualquier forma que sea la mejor adaptada para -  
30 los fines y la aplicación que se pretenden. Puede

270793



usarse el líquido de fermentación que ha alcanzado el grado deseado de desarrollo, tal como se mide en el re cu en to de cé l u l a s o e s p o r a s o e l n ú m e r o d e c u e r p o s d e i n c l u s i ó n.- Preferiblemente, estas composiciones se -  
5 concentran hasta el grado que se desee.- Igualmente, -  
pueden usarse composiciones sólidas.- Pueden presentar  
se en forma de polvos mediante la incorporación de só-  
lidos finamente divididos a los ingredientes activos.-  
Pueden también prepararse polvos mojables que se pueden  
10 extender con agua para dar rociados diluidos.- El pol-  
vo mojabable puede comprender un agente de dispersión y  
un sólido finamente dividido.- Las composiciones lí-  
quidas pueden mezclarse también en forma de concentra-  
dos emulsificables que, después de diluir en agua, pro-  
15 porcionan rociados eficaces.- Entre los emulsificad-  
ores típicos que pueden emplearse figuran alcoholfenoxi  
polietoxietanoles que contienen desde, aproximadamente,  
6 a 10 unidades etoxi por molécula, surfactantes polí-  
meros tal como los que resultan de la reacción de con-  
20 densados fenol-formaldehido con óxido de etileno, con-  
densados de resina glicerol alquídica-anhidrido ftáli-  
co acuosolubles, sulfonatos de alcohol y de alcarilo,  
sulfonatos de alcoholamida ésteres de ácido graso de -  
polioles, los productos de adición de óxido de etileno  
25 de dichos ésteres y los productos de adición de mercap-  
tones de cadena larga y óxido de etileno.- Entre los  
sólidos útiles en los polvos mojables figuran arcillas,  
pirofilita, talco, tierra de diatomeas, silicato cálcico,  
carbonato magnésico, o carbonato cálcico, y células  
30 filtrantes, roca de fosfato molido, tallos de tabaco, -

270793



y azufre.- Igualmente, pueden usarse líquidos orgánicos, tal como aceite, como vehículos, solos o en unión de los otros ingredientes: son aceites vegetales típicos los de coco, aceite de pino, naftas, naftaleno metilado, xileno y análogos.- Estos coadyuvantes pueden  
5 agregarse a la composición del invento en cualquier momento.- Pueden agregarse en el medio o durante cualquier operación que conduzca a la preparación de las composiciones deseadas, líquidas o sólidas.- Convenientemente,  
10 te, los residuos de células bacterianas actúan también como vehículo o diluyente en las composiciones del invento.

Las composiciones plaguicidas microbianas del invento son útiles para combatir numerosas plagas,  
15 generalmente las clases de Artrópodos tal como las clases de Insectos y Aracnidos y, por ejemplo, los de orden Lepidopteros.- Por ejemplo, las composiciones del invento son útiles para el control de varias plagas, -  
tal como gusano de las coles importadas, loopers de --  
20 las coles, polillas plumosas de alcachofa, y gusanos de oreja del maíz; sobre varias cosechas vegetales, --  
tal como coles, coliflores, brécoles, apio, lechuga, -  
espinacas, patatas, alcachofas, frijoles y análogos; -  
para el control de gusano astado, oruga de la alfalfa,  
25 gusano cortador del ejército, orugas de las marismas, -  
gusano de oreja del maíz, y taladrador del maíz europeo; sobre varias cosechas agrícolas, tal como tabaco, alfalfa, maíz, algodón y análogos; para el control de  
las plagas tal como la polilla del manzano, enrollador  
30 de la hoja de banda roja, oruga gangrenosa, perforador



de la hoja del algodón, gusano "atrevido", looper de las coles, gusano del melón, y otros insectos que infestaron los frutos, tal como manzanas, uvas, bayas, melones, tomates, etc; para el control de las larvas de la mariposa de las coles, oruga de las tiendas de campaña, polilla "copetuda", polilla de la harina de la India, y otros; para el control de plagas, tal como la polilla gitana, p.ej. en el olmo, y otros árboles caedizos y no caedizos; para el control de plagas, tal como el ácaro de las aves de corral, piojo de las aves de corral, larvas de mosquito, y larvas de mosca y análogas.- En aplicaciones contra larvas de mosca y plagas análogas, las composiciones del presente invento pueden emplearse como suplemento de los piensos de varios animales.- Después de excreción, como componente del estiércol, inhiben eficazmente el desarrollo de las larvas de mosca y otras de plagas nocivas.

Los siguientes ejemplos pueden ilustrar mejor el invento.- Las partes son en peso, a no ser que se indique otra cosa.- Se verá evidentemente por los expertos en esta técnica que pueden usarse fácilmente, sin apartarse del alcance de este invento, materiales equivalentes y técnicas sustitutivas concebidas para alcanzar objetivos semejantes.

### E J E M P L O S 1 - 3

Los inóculos usados en los matraces y calderas se preparan desarrollando las bacterias esporógenas seleccionadas sobre la superficie de agar nutriente durante 48 a 72 horas, a 30°C., el tiempo para obte



ner un cultivo completamente esporulado.- El desarrollo a partir del cultivo de agar se suspende en agua - destilada, estéril, y se usan partes alícuotas de esta suspensión para inocular los medios de desarrollo estériles.

La bacteria se desarrolla a una temperatura dentro de los límites de 20 y 35° C., generalmente de alrededor de 30° C.; El pH se mantiene preferiblemente dentro de los límites de 6 y 8.- Los sólidos nutrientes totales se indican como TNS por ciento.- El agua de maceración del maíz se calcula como sólidos al 50%.- Todos los recuentos de células son recuentos máximos de células.- En las Tablas, las partes representan por ciento en peso.- Durante el desarrollo de las células, se toman muestras y se cuentan células para seguir su desarrollo.

En los siguientes ejemplos, el microorganismo es Bacillus thuringiensis.

T A B L A I

Ejemplos (a)	1	2	3
<u>Medio</u>			
Sacarosa	1	2	1
Agua de maceración del maíz	1	1	1
Levadura seca	0.4	0.4	0.4
Caseína	1.5	1.5	-
Almidón de maíz	3.75	0	-
Amortiguador fosfato	0.9	0.9	-
TNS	7.15	4.4	2
Recuento celular ( x 10 <sup>9</sup> )	3.2	1.8	20.5



Se obtiene esporulación total en las células.- Los cultivos líquidos de 1 (a), 2(a) y 3(a) son tóxicos para los gusanos del ejército del sur y las orugas de las marismas.- Luego se tratan porciones del medio de desarrollo agotado integral de 1(a), 2(a) y 3(a) mezclando de 0,5 a 3% de  $\text{CaCl}_2$ .- Se deposita en el fondo un floculante.- Sobre el medio integral, se añade entonces suficiente hidróxido potásico para llevar el pH a 6,5 y se agrega aproximadamente 2% de tierra de diatomeas.- Luego se filtra el medio agotado total.- Se recoge la torta de filtración y se seca al aire en bandejas.- La torta se micropulveriza hasta obtener un polvo de color "beige" suelto.- Los rociados de este polvo dieron una  $\text{DL}_{50}$  de 100 ppm. sobre orugas de las marismas.

1(b) - Se trató una porción del medio agotado integral de la parte 1(a), empleando  $\text{MgCl}_2$  en lugar de  $\text{CaCl}_2$ .- Se recoge la torta de la misma manera que en (a).

EJEMPLO 2  
(b) - Análogamente, se emplea  $\text{BaCl}_2$  en lugar de  $\text{CaCl}_2$ .

EJEMPLO 3  
(b) - Se mezcla cloruro amónico con el medio agotado.- El producto se concentra y se añaden 0,5 partes de una resina glicerol alquídica-ftálica modificada como agente humectante.- El producto se seca hasta dar un polvo.- Este producto es tóxico para las larvas de orugas de las marismas que infestan las hojas de los frijoles.

Los siguientes bacilos (Tabla II) se desarrollan en frascos agitados de 1 litro en el medio si-

278793



guiente (Tabla III) a 30° C. en un agitador rotatorio.

T A B L A II

<u>Ejemplo</u>	<u>Bacillus</u>
5 4(a)	<u>Bacillus thuringiensis Berliner</u>
5(a)	<u>Bacillus sotto</u>
6 (a)	<u>Bacillus thuringiensis var. alesti</u>
7(a)	<u>Bacillus entomocidus</u>
8(a)	<u>Bacillus thuringiensis galleriae</u>
10 9(a)	<u>Bacillus bombyces Pasteur</u>
10(a)	<u>Bacillus thuringiensis Cazaubon</u>

T A B L A III

<u>Medio</u>	
15 Almidón de maíz	2.2
Sacarosa	0.2
Caseína	0.6
Agua de maceración del maíz	1.5
20 Levadura	0.2
Fosfatos	0.2

Se obtiene desarrollo y esporulación profusos en 50 a 70 horas.

E J E M P L O S 4 a 10(a)

25 Se defeca con cloruro cálcico el medio de fermentación agotado de cada matraz.- Se reajusta el pH del cultivo a pH 6,5 con hidróxido sódico y se añade 2% de tierra de diatomeas.- Luego se filtra el material y se seca la torta de filtración.- Se pulveri-

30



zan las tortas.- Las suspensiones acuosas son tóxicas para el gusano del ejército del sur y las orugas de -- las marismas.

5 Los siguientes ejemplos se realizan en calderas de 8 litros con 4 litros de medio.- Se proporciona agitación con un agitador mecánico y con burbujeo de aire; la temperatura se mantiene en 30° C.- Los ensayos se hacen con Bacillus thuringiensis

10 T A B L A IV

Ejemplos (a)	11	12	13	14
<u>Medio</u>				
Melazas	0	0	0	3,25
Almidón de maíz	9.0	2.6	4.5	2.6
15 Sacarosa	0.81	2.6	0.9	0
Caseína	3.65	1.9	2.0	0
Líquido de maceración de maíz	3.65	4.7	2.0	4.7
Harina de semilla de algodón	0	0	0	1.9
Amortiguador fosfato	0.77	0.6	0.80	0.6
20 Levadura seca	0.81	0.65	0.54	0.65
TNS	16.1	10.1	9.0	10.1
Recuento celular ( x 10 <sup>9</sup> )	13	14	20	13

25 Se observa el recuento celular vegetativo máximo al cabo de 20-30 horas; al cabo de 32-36 horas más las células están esporuladas y más de 95% de las esporas y cuerpos de inclusión están liberados por la autólisis de las células.

E J E M P L O II

30 (b) - Se defeca el medio con cloruro cálcico

276793



cico.- El precipitado se separa por filtración y se -  
 seca.- Los rociados del polvo matan las orugas de las  
 marismas, los gusanos del ejército del sur, y las lar-  
 5 vas de mosca.

E J E M P L O 12

(b) - Se repite el apartado (a), usando -  
Bacillus bombyces.

10 (c) - Se concentra el medio 3 veces bajo  
 vacío.- Las muestras de este concentrado son tóxicas  
 para los gusanos del ejército del sur, las orugas de -  
 las marismas y las larvas de mosca.

E J E M P L O 13

15 (b) - Se seca por atomización el medio hasta  
 obtener un polvo.- Este material es tóxico para los gusa-  
 nos de las coles, loopers de las coles, y polilla plumo  
 sa de la alcachofa cuando se diluye y se aplica como --  
 20 polvo a dosis de 9,07 kg a 13,60 kg. por cada 0,4047 Ha.

E J E M P L O 14

(b)-1).- Se filtra el medio.- El filtra-  
 do se trata con cloruro cálcico al 3%.- El precipitado  
 25 se seca hasta dar un polvo.- Si se aplica en forma de  
 polvo, controla los gusanos del ejército sobre las ho-  
 jas de los frijoles.

-2).- La torta de filtración de (1) se  
 seca, se mezclan 30 partes con 30 partes del polvo de -  
 30 14(b)-1).- El polvo resultante es tóxico para los "gu-

276793



sanos del ejército" y las orugas de las marismas.

(c) - Se concentra el conjunto al doble -  
bajo vacío; luego se trata con hidróxido potásico (pH\_  
12), disolviendo así los cuerpos de inclusión.- Se --  
5 filtra el líquido, recogiendo así las esporas.

E J E M P L O S 15 a 18

En los siguientes ejemplos, se desarrolló  
Bacillus thuringiensis en calderas de 20 litros.- La\_  
10 temperatura está comprendida entre 25 y 35° C.- Se --  
procura agitación mecánica por medio de un motor; se -  
hace burbujear aire a través del medio para aireación.  
Se usan los siguientes medios.

15 T A B L A V

Ejemplos (a)	15	16	17	18
<u>Medio</u>				
Sacarosa	3.5	1.3	0.64	0.64
Caseina	2.0	2.0	1.9	1.9
20 Licor de maceración del maíz	4.8	4.8	4.7	4.7
Almidón de maíz	0	2.2	6.8	6.8
Amortiguador fosfato	0.6	0.6	0.6	0.6
Levadura seca	0.7	0.7	0.6	0.6
TNS	8.5	8.6	12.3	12.3
25 Recuento celular ( x 10 <sup>9</sup> )	7.7	6.9	14	16

Se produce una esporulación de más de 95%  
en 52-56 horas.- Los lotes se paran en las próximas 4  
a 8 horas en cuyo tiempo la pared celular se ha autoliza\_  
do más de 95%.  
30

170703



E J E M P L O S 15 a 18

5 Se concentra al triple una porción del líquido de fermentación agotado.- Se añade uno por ciento de dioctisulfosuccinato sódico.- Las composiciones son tóxicas para larvas de mosca.

15(b) - Sobre otra porción del medio agotado de 15(a) se añade NaCl al 10%.- La composición líquida es eficaz contra gusanos del ejército.

10 16(b) - El medio de fermentación agotado se mezcla con tierra de diatomeas y se seca en un secador rotatorio.- El producto seco es tóxico para el gusano orejudo del maíz, para el gusano astado del tabaco y los frijoles.

15 17(b) - A la totalidad del cultivo, se añade sacarosa al 1%; el líquido se incuba en un agitador rotatorio durante 12 horas a 30<sup>o</sup> C., con lo cual germinan las esporas.- Se agita el cultivo con un volumen igual de triclorotrifluoroetano, dando dos fases y una emulsión en la intercara.- Los cuerpos de inclusión y las esporas sin germinar residuales se concentran en la fase acuosa mientras las células vegetativas se concentran en la capa interfacial.- Se separa la fase acuosa.- Las esporas residuales se germinan como se ha dicho arriba, y se repite el tratamiento con el líquido orgánico para obtener un producto esencialmente libre de esporas y que comprende toxinas acuosolubles y cuerpos de inclusión.- La composición líquida es tóxica para orugas de las marismas y gusanos del ejército del sur.

30 17(c) - Se prepara un polvo mojable mez-

10733



clando 2 partes de tierra de diatomeas y 0,10 partes de un octilfenoxipolietoxietanol, que tiene un promedio de 10 grupos éter, con 100 partes del líquido anterior y secando por atomización el producto.- Es tóxico para los gusanos del ejército del sur y las orugas de las marismas.

5

17(d) - Se repite el apartado 17(b), usando diclorotetrafluoroetano como líquido orgánico.

Se emplean de manera análoga otros líquidos orgánicos inmiscibles en agua.

10

18(b) - Se prepara un rociado a partir de torta seca.- Tiene una DL<sub>50</sub> de 38 ppm. sobre orugas de las marismas.

E J E M P L O 19

15

Se repite el procedimiento de los Ejemplos 15 a 18 pero se ajusta el TNS a 6,75.- La composición líquida es tóxica para larvas de insectos.

E J E M P L O S 20 y 21

20

En los siguientes ejemplos, se desarrolla Bacillus entomocidus en calderas de 8 litros a 30<sup>o</sup> C.- El medio es el siguiente:

T A B L A VI

25

Ejemplos (a)	20	21
<u>Medio</u>		
Almidón de maíz	6.8	2.6
Sacarosa	0.64	2.6
Caseina	1.9	1.9
Licor de maceración del maíz	4.7	4.7

30

793



sigue TABLA VI

	Extracto de levadura	0.64	0.65
	Amortiguador fosfato	0.8	0.8
	TNS	12.3	10.1
5	Recuento celular ( x 10 <sup>9</sup> )	12	12

Después de 50 horas, se paran los lotes.

20-21(b) - Se repite el apartado (a), empleando un equivalente de maíz molido en lugar de almidón de maíz y sacarosa.

10 20(c) - Se trata una porción del medio con cloruro cálcico y se seca el precipitado resultante.

Un rociado mojable, preparada a partir del mismo, con dodecilsulfato sódico, da una DL<sub>50</sub> de 72 ppm. sobre orugas de las marismas.- La composición da una DL<sub>50</sub> de menos de 2500 ppm. sobre gusano del ejército.- Es eficaz para controlar larvas de mosca doméstica en los excrementos ganado vacuno y en aves de corral cuando se usa a dosis de 0,25 a 2 gr./ 0,453 kg. de pienso.

20 20(d) - En el apartado 20(c), se emplea cloruro amónico en lugar de cloruro cálcico y la composición se concentra y se seca.

20(e) - En el apartado 20(d), se emplea acetato amónico en lugar de cloruro amónico.

25 20(f) - En el apartado 20(d), se emplea acetato sódico en lugar del cloruro amónico.

30 21(c) - Una muestra del medio de cultivo completo final tiene una DL<sub>50</sub> sobre gusanos del ejército del sur de 50.000 ppm.- El medio se acidifica a un pH de 3,5 - 4,0 con ácido clorhídrico y se filtra.- El filtrado se ajusta a un pH de 6,5 con hidróxido sódico



y se mezcla con suficiente cloruro cálcico para dar un precipitado.- Una muestra del precipitado tiene una DL<sub>50</sub> de 1.000 ppm. sobre gusanos del ejército del sur. Luego se redisuelve en agua acidificada a un pH de 3,5 con ácido clorhídrico.- Se añade oxalato potásico hasta que no se forma más precipitado.- El precipitado de oxalato cálcico se separa por filtración y el pH del filtrado se ajusta a 6,5 con hidróxido potásico y se evapora a sequedad, dando un producto con una DL<sub>50</sub> de 500 ppm. sobre gusanos del ejército.- Es soluble en agua.

21(d) - En el apartado (c), se emplea cloruro de bario en lugar del cloruro cálcico para dar un precipitado.

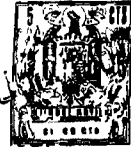
21(e) - En el apartado (c), el oxalato potásico se reemplaza por oxalato amónico.- La solución es tóxica para gusanos del ejército del sur.

E J E M P L O 22

Se mezclan 100 partes del producto secado de 20(c) con 100 partes de la composición obtenida en 17(c).- El producto resultante es tóxico para gusanos del ejército del sur y para orugas de las marismas.

E J E M P L O 23

En 100 partes del producto de 17(c), se mezclan 100 partes del producto obtenido en 14(c).- El producto resultante es tóxico para gusanos del ejército del sur y para orugas de las marismas.



E J E M P L O S 24 a 26

En los siguientes ejemplos (24-25), se desarrolla Bacillus thuringiensis en tanques de 113,5 litros; en el Ejemplo 26, se usa un tanque de 9.462 litros.  
5 La temperatura es de 30-35°.

T A B L A VII

Ejemplos (a)	24	25	26
<u>Medio</u>			
10 Almidón de maíz	6.8	2.6	2.6
Sacarosa	0.64	2.6	2.6
Caseína	1.9	1.9	1.9
Licor de maceración del maíz	4.7	4.7	4.7
Levadura	0.64	0.65	0.65
15 Amortiguador fosfato	0.6	0.60	0.60
TNS	12.3	10.1	10.1
Recuento celular ( x 10 <sup>9</sup> )	14	12	12

24(b) - El medio de fermentación final se concentra al triple y se obtiene un material en polvo por secado por congelación.- Este polvo es tóxico para larvas de insectos.

25 25(b) - El medio de fermentación final se trata con cloruro bórico, causando así la formación de un precipitado.- El material insoluble se separa por filtración.- Se seca.- Un polvo mojable del mismo es tóxico para los gusanos del ejército.

30 26(b) - El medio de fermentación final se concentra el doble.- Las esporas contenidas en el líquido regerminan añadiendo a las mismas melazas; se se paran las células vegetativas, obteniendo así un líquido

275793



do libre de la mayor parte de esporas.- El producto se  
seca por atomización después de añadir octilfenoxipolie  
toxiolanol al 0,1%.- El producto resultante es tóxico  
para orugas de las marismas.

5                    24(c) - Otra porción del medio de fermenta  
ción final se seca por atomización.- Sobre 50 partes -  
del producto se añaden 500 partes de silicato de alumi-  
nio anhidro.- El producto, que contiene  $6 \times 10^9$  esporas/  
gramo, se aplica en forma de polvo seco a la dosis de -  
10                    aproximadamente 4,535 kg/0,4047 Ha. para combatir los -  
loopers de las coles.

                    25(c) - Se prepara un concentrado mezclan-  
do 90 partes del medio final con 2 partes de una resina  
glicerol alquídica-anhidrido ftálico acuosoluble.- El  
15                    producto se seca por atomización y se micropulveriza.--  
Este producto es tóxico para el gusano de las yemas del  
tabaco.

                    26(c) - Se prepara un concentrado de emul-  
sión como sigue: Se mezclan partes iguales de aceite de  
20                    coco y del producto obtenido por secado por atomización  
como se indica en 25(a), con 5 partes de octilfenoxipo-  
lietoxietanol.- El concentrado es auto-emulsificante -  
cuando se mezcla con agua.- Es aplicable a los olmos -  
para combatir las polillas gitanas.

25                    ENSAYOS DE TOXICIDAD

1) Cresa de la mosca doméstica (Musca doméstica)

                    Se coloca en el fondo de una placa Petri  
ø 100 x 100 x 20 mm) un papel de filtro ( 75 mm.) y se  
30                    pone 1 ml. de agua sobre el papel de filtro.- Se lavan

276793



huevo de mosca con agua a 30°C. y se prepara una sus-  
pensión acuosa que contiene aproximadamente 25 huevos por  
ml.- Se pasa, por medio de una pipeta, 1 ml. de esta  
suspensión sobre cada pieza de papel de filtro sobre  
5 las placas Petri.- Se cuenta el número de huevos en  
cada placa con un contador de colonias.- Las placas  
se incuban durante 6 horas a 30°C. a 50% de humedad --  
relativa.- Al cabo de este tiempo, se pasa, por medio  
de una pipeta, 1 ml. de una dilución apropiada del ma-  
10 terial de ensayo a cada placa.- Todas las concentra-  
ciones se hacen por duplicado y generalmente se ensayan  
para cada muestra cuatro o cinco de las diluciones quin-  
tuples o de las décuples.- Las placas se incuban duran-  
te 24 horas a 30°C, 50% de humedad relativa, y se cuen-  
15 ta el número de crías muertas.- Se calcula un por --  
ciento de muertes a base del número de huevos original-  
mente usados.- Se representan gráficamente los datos --  
y se determina el valor de DL<sub>50</sub>.

20 2) - Gusano del ejército del sur (*Prodemia eridania*)

El material que se quiere ensayar se prepa-  
ra en varias concentraciones, incluyendo una dilución -  
desde 50% a 0,5% de concentración, usando incrementos -  
quíntuples y décuples.- Las diluciones se rocían para  
25 que actúen sobre las hojas primarias de plantas de frí-  
joles de 7 a 10 días.- Se coloca luego una jaula con-  
teniendo 10 larvas del insecto, de 10 días de edad, y -  
en la cuarta muda, sobre la sección de hoja de la plan-  
ta.- Se hacen cuatro réplicas por cada dilución de la  
30 serie.- Las larvas sobre las plantas enjauladas se man-



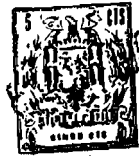
5 tienen en un recinto iluminado a 23,8°C - 25,5°C. y -  
45% de humedad relativa.- Después de 4 días, se reti-  
ran las jaulas y se determina el porcentaje de larvas  
muertas, incluyendo las incapaces de movimiento coordi-  
nado.- Al mismo tiempo, si se desea, puede determinarse  
se el porcentaje de alimentación a partir de una estima-  
ción del daño real de la hoja.- Se determina la DL<sub>50</sub> a  
partir de un gráfico de los resultados para cada concen-  
tración.

10 3) - Orugas de las marismas ( Estigmene acrea )

15 Se rocían plantas de frijol, de 7 a 10 días  
de edad, con el material de ensayo, a las diluciones de-  
seadas, para que rebose.- Cada concentración se repite 4  
veces con cada réplica constituida por 10 orugas.- Las  
plantas se incuban a 23,8-25,5°C. a 50% de humedad re-  
lativa.- Al cabo de cuatro días, se cuenta el número de  
orugas muertas para cada concentración.- La DL<sub>50</sub> se de-  
termina a partir de un gráfico de los resultados para ca-  
da concentración.

20 Esta solicitud, que corresponde a la presen-  
tada en E.U.A., el 2 de Mayo de 1961, bajo el número --  
107.013 y 107.014, se acoge a los beneficios del artícu-  
lo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

25



--- N O T A ---

5 Los puntos de invención propia y nueva -  
que se presentan para que sean objeto de ésta Patente\_  
de Invención en España, por VEINTE años, son los si-\_  
guientes:

10 1.- Mejoras introducidas en la prepara-  
ción de composiciones pesticidas, según las cuales di-  
chas composiciones comprenden una o más de las esporas,  
cuerpos de inclusión y toxinas solubles en agua de un\_  
Bacillus que forma cuerpos de inclusión.

15 2.- Mejoras según el punto 1, según las\_  
cuales dichas esporas y/o cuerpos de inclusión han sido li-  
berados de la célula en el Bacillus en el cual estaban  
anteriormente contenidos.

3.- Mejoras según los puntos 1 y 2, según  
las cuales las esporas no son viables.

20 4.- Mejoras según cualquiera de los pun-  
tos 1 a 3, según las cuales dicho número de esporas es  
superior a  $25 \times 10^9$  por gramo.

5.- Mejoras según el punto 4, según las\_  
cuales dicho número de esporas es al menos de  $60 \times 10^9$   
por gramo.

25 6.- Mejoras según cualquiera de los pun-  
tos 1 a 3, según las cuales dicha composición es líqui-  
da y dicho número de esporas es al menos de  $7 \times 10^9$  --  
por mililitro.

30 7.- Mejoras según los puntos anteriores,  
según las cuales el Bacillus es Bacillus Sotto, Baci-



Ilus Entomocidus o Bacillus Thuringiensis.

8.- Mejoras según cualquiera de los puntos 1 a 7, según las cuales dichas composiciones tienen una DL<sub>50</sub> sobre Prodemia Eridania de no más de 50.000 partes por millón y una DL<sub>50</sub> sobre Estigmene Acrea de no más de 3000 partes por millón.

9.- Mejoras según el punto 8, según las cuales dichas composiciones tienen una DL<sub>50</sub> sobre Prodemia Eridania de no más de 25.000 partes por millón y una DL<sub>50</sub> sobre Estigmene Acrea de no más de 1000 partes por millón.

10.- Mejoras según cualquiera de los puntos 1 a 9, según las cuales dichas composiciones comprenden también un vehículo inerte líquido o sólido.

11.- Mejoras según cualquiera de los puntos 1 a 10, según las cuales dichas composiciones contienen los cuerpos de inclusión esporas de un Bacillus que forma cuerpos de inclusión.

12.- Mejoras según cualquiera de los puntos 1 a 11, según las cuales la proporción relativa de esporas a cuerpos de inclusión está en la gama de 1 a 1000 y 1000 a 1.

13.- Mejoras según cualquiera de los puntos 1 a 10, según las cuales dichas composiciones contienen los cuerpos de inclusión y toxinas solubles en agua de un Bacillus que forma cuerpos de inclusión.

14.- Mejoras según cualquiera de los puntos 1 a 10, según las cuales dichas composiciones contienen las esporas y toxinas solubles en agua de un Bacillus que forma cuerpos de inclusión.

15.- Mejoras según cualquiera de los puntos 1 a 10, 13 y 14, según las cuales la toxina solu-

278793



ble en agua está en la forma de una sal insoluble en -  
agua.

5 16.- Un método de exterminación de pes-  
tes por aplicación a un ambiente infectado de peste de  
una composición que comprende una o más de las esporas,  
cuerpos de inclusión y toxinas solubles en agua de un  
Bacillus que forma cuerpos de inclusión.

17.- Un método según el punto 16, carac-  
terizado porque el ambiente está infectado por larvas.

10 18.- Mejoras introducidas en la prepara-  
ción de composiciones insecticidas, según las cuales -  
se cultiva un Bacillus que forma cuerpos de inclusión,  
en condiciones sumergidas, aerobias, en un medio que -  
comprende hidrato de carbono asimilable y nitrógeno --  
15 asimilable, y se separan los productos que comprenden  
las esporas, los cuerpos de inclusión y las toxinas so-  
lubles en agua de dicho Bacillus.

20 19.- Mejoras según el punto 18, caracterizadas  
porque el Bacillus se cultiva hasta que el número de -  
población exceda de  $5 \times 10^9$  células por mililitro.

20.- Mejoras según el punto 19, caracte-  
rizadas porque el Bacillus se cultiva hasta que más del  
90% de las células del Bacillus hayan desarrollado una  
espora y un cuerpo de inclusión.

25 21.- Mejoras según cualquiera de los pun-  
tos 18 a 20, caracterizadas porque el Bacillus se cul-  
tiva hasta que al menos el 60% de la población de célu-  
las del Bacillus hayan liberado sus esporas y cuerpos  
de inclusión.

30 22.- Mejoras según cualquiera de los pun



tos 19 a 21, caracterizadas porque el Bacillus se cultiva hasta que los números de población excedan de  $7 \times 10^9$  células por mililitro.

5           23.- Mejoras según cualquiera de los puntos 19 a 22, caracterizadas porque el Bacillus es Bacillus Sotto, Bacillus Entomocidus o Bacillus Thuringiensis.

10           24.- Mejoras según cualquiera de los puntos 19 a 23, caracterizadas porque el hidrato de carbono asimilable y el nitrógeno asimilable totalizan, al menos, un 6% de sólidos nutricios.

15           25.- Mejoras según el punto 24, caracterizadas porque el hidrato de carbono asimilable y el nitrógeno asimilable totalizan al menos el 8% de sólidos nutricios y preferentemente 10% de sólidos nutricios.

            26.- Mejoras según cualquiera de los puntos 18 a 25, caracterizadas porque las toxinas solubles en agua se precipitan desde el medio.

20           27.- Mejoras según el punto 26, caracterizadas porque se utiliza una sal metálica alcalino-térrica, preferiblemente cloruro cálcico para precipitar las toxinas solubles en agua.

25           28.- Mejoras según cualquiera de los puntos 18 a 25, caracterizadas porque se concentra el producto obtenido por cultivo del Bacillus y que incluye esporas, cuerpos de inclusión y toxinas solubles en agua.

            29.- Mejoras según el punto 28, caracterizadas porque se seca el producto.

30           30.- Mejoras según cualquiera de los pun-



tos 18 a 27, caracterizadas porque se separan individualmente desde el medio las esporas, cuerpos de inclusión y toxinas solubles en agua.

5 31.- Mejoras según el punto 30, caracterizadas porque se retiran las esporas desde los cuerpos de inclusión por tratamiento con alcali acuoso.

32.- Mejoras según el punto 30, caracterizadas porque se separan los cuerpos de inclusión de las esporas, germinando esporas.

10 33.- Mejoras según cualquiera de los puntos 30 a 32, caracterizadas porque las esporas, cuerpos de inclusión y toxinas solubles en agua separados se recombinan en cualquier proporción deseada.

15 34.- MEJORAS INTRODUCIDAS EN LA PREPARACION DE COMPOSICIONES PESTICIDAS.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de cuarenta y seis hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

20

Madrid,

8 JUN. 1952  
P. A.

Alberto de Eizabara  
Por Poder

276793