

20 JUL. 1978

ES

11

21

22

NUMERO

465.744

A3

FECHA DE PRESENTACION

3.1.78



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INTRODUCCION

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D; A01N
------------------------	--

54 TITULO DE LA INVENCIÓN  UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN INSECTICIDA MICROBIANO.
--

56 PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION Patente suiza 587 014 concedida el 15 de marzo de 1.977
---

71 SOLICITANTE (ES) CRC COMPAGNIA DI RICERCA CHIMICA S.A.
--

DOMICILIO DEL SOLICITANTE Corso San Gottardo 35, 6830 CHIASSO, Suiza.
--

72 INVENTOR (ES)
------------------

73 TITULAR (ES)
-----------------

74 REPRESENTANTE D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU
--

1                   La presente invención trata de la preparación  
de insecticidas microbianos mediante el cultivo de Bacillus  
thuringiensis o bacilos afines.

5                   Por lo tanto, esta invención se relaciona con un  
nuevo procedimiento para la biosíntesis de un insecticida  
microbiano que contiene esporas y endotoxina cristalina,  
que se caracteriza porque el microorganismo Bacillus thurin-  
giensis o un bacilo similar se cultiva en un medio nutriti-  
vo, con formación de esporas, de modo que se impida la pre-  
10                   matura lisis de las células causada por la aireación durante  
el cultivo sumergido, antes de finalizar la formación de  
las esporas.

15                   Se conoce que la lisis prematura de las célu-  
las durante el cultivo trae consigo bajos rendimientos y  
efectividad menor del bioinsecticida a la vez que aumenta  
su toxicidad.

20                   La presente invención provee un método mejorado  
para la producción de esporas y endotoxina cristalina en el  
procedimiento en el cual la lisis prematura de las células  
bacterianas se produce normalmente como resultado de proce-  
sos enzimáticos inducidos por la aireación.

25                   La demora en la formación de las esporas duran-  
te el desarrollo vegetativo de las bacterias se atribuye a  
la acción de uno o más inhibidores de naturaleza proteínica.  
La descomposición proteolítica de dichos inhibidores produ-  
ce el comienzo de la formación de esporas. Aparte de esto,  
se han formulado diversas teorías respecto a la función de  
la proteasa, que es uno de los primeros fenómenos relaciona-  
dos con el comienzo de la formación de esporas (J. Mandels-  
30                   tam und W.M. Waites, Biochem. J. Vol. 109, páginas 793 a 801.

1 1968). Schaeffer sugirió que durante el desarrollo de las  
bacterias en un sustrato nutritivo rápidamente metabolizado  
y en presencia de una fuente de nitrógeno utilizable, po-  
drían formarse productos metabólicos que suprimieran la  
5 síntesis de proteasas extracelulares y de un enzima especí-  
fico para la formación de las esporas, posiblemente de mane-  
ra similar al ciclo de Krebs (P. Schaeffer, Bacteriol. Rev.  
vol. 33, páginas 48 a 71, 1969). El resultado de esta supre-  
sión sería una acumulación de ácido acético y ácido pirorra-  
10 cémico, lo que causaría una disminución del valor pH y la  
lisis prematura de las células bacterianas en general.

De acuerdo con una forma de realización prefe-  
rida de la presente invención, la lisis prematura de células  
bacterianas en la esporulación se ha logrado impedir ahora  
15 realizando la biosíntesis en condiciones anaeróbicas durante  
4 a 6 horas y manteniendo el valor pH del medio de cultivo,  
durante la biosíntesis, en la gama desde 6,3 a 7.

Mediante la presente invención ha sido posible  
obtener, entre otros productos, cuerpos proteínicos crista-  
linos-paraesporales (delta-endotoxina), y separar de estos  
20 la exotoxina hidrosoluble (betaexotoxina), que debe separar-  
se dada su toxicidad para los mamíferos. De acuerdo con la  
presente invención, la mejor manera de separar la exotoxina  
consiste en usar membranas semipermeables, por ejemplo me-  
25 diante diálisis.

Es conocido que microorganismos del grupo del  
Bacillus thuringiensis se caracterizan por la formación de  
cristales de endotoxina paraesporal que contienen proteína.  
La naturaleza patógena para insectos del Bacillus thuringien-  
30 sis, por ingestión, en una extensa gama de larvas de lepi-

1 dópteros, se atribuye principalmente a la acción de la en-  
doxina. Ciertas cepas de *Bacillus thuringiensis* forman,  
además de la endotoxina intracelular, una exotoxina extra-  
5 celular termoestable hidrosoluble. Con la palabra "exotoxi-  
na" se quiere significar una sustancia activa proveniente  
de células vivas, que se libera en el medio; en contraste  
con la endotoxina, que se libera solamente después de la di-  
solución total de las células.

10 A fin de facilitar la interpretación de la pre-  
sente invención se describirán ahora detalladamente las par-  
ticularidades y propiedades características de las susodi-  
chas toxinas.

#### La endotoxina cristalina

15 Una inclusión cristalina que contenía proteína  
fue aislada del cultivo esporulado de *Bacillus thuringien-*  
sis por Hannay y Fitz-James (C.L. Hannay y P. Fitz-James,  
Can. J. Microbiol., vol. 1, páginas 694 a 710, 1955). Estu-  
dios efectuados en el microscopio electrónico demostraron  
20 que durante la formación de esporas de bacterias del *Baci-*  
*llus thuringiensis* se forma un cuerpo cristalino esporal,  
juntamente con las esporas. Se llegó también a la conclu-  
sión de que existe una nueva relación entre la formación de  
las esporas y los cristales de endotoxina. Investigaciones  
recientes han demostrado que la endotoxina cristalina con-  
25 siste en un componente proteínico de alto peso molecular y  
un esqueleto de sílicio. Las esporas y los cristales de en-  
dotoxina pueden obtenerse del cultivo, es decir del medio  
de cultivo, del sedimento en una centrifugadora de alto ren-  
dimiento. La separación de la endotoxina cristalina de las  
30 esporas puede efectuarse de diferentes formas; por ejemplo

1 por sedimentación fraccionada, sedimentación por pasos progresivos y serparación en un sistema bifásico.

La exotoxina

5 Además de la endotoxina cristalina, ciertas cepas de Bacillus thuringiensis liberan en el medio, durante la fase de desarrollo vegetativo, una fracción tóxica que está químicamente relacionada con nucleótidos adenínicos. No hay conexión entre la producción de endotoxina cristalina y la de exotoxina. Según se aclaró mediante investigaciones, solo ciertos genotipos de variedades especiales  
10 de Bacillus thuringiensis pueden formar la exotoxina. El método para producir exotoxina fue desarrollado por De Barjac. De acuerdo con este método, el Bacillus thuringiensis se cultiva en un medio que contiene sales minerales además de  
15 un 0,75% de peptona y un 1% de glucosa, durante 70 horas a 30°C.

De acuerdo con la presente invención, los insecticidas microbianos se producen, con preferencia, mediante las siguientes operaciones:

20 (A) El cultivo

Los cultivos se forman con esporas de un cultivo original de bacterias del Bacillus thuringiensis.

25 Un medio nutritivo apropiado para producir el inóculo vegetativo en recipientes agitados, contiene los siguientes constituyentes:

	bacto-tripton (Difco)	0,8% en peso
	glucosa	2,5% " "
	Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2% " "
	Zn SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2% " "
30	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0,2% " "

1

Mn SO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 0,1% en peso

Un medio apropiado para cultivos en placas de agar es igual al anteriormente citado con adición de un 2% de agar.

5

Se obtienen buenos resultados si el cultivo se realiza en los siguientes medios:

Medio I

melaza (al 50% de sólidos) 1,4% en peso

levadura 0,3% "

10

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 0,1% "

líquido de maíz macerado 0,1% "

Ca CO<sub>3</sub> 0,1% "

pH después de esterilizar 6,8

15

O con el medio, que en lugar de melaza contiene almidón

Medio II

Almidón 1,3% en peso

levadura 1,0% "

20

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4% "

líquido de maíz macerado 0,2% "

Ca CO<sub>3</sub> 0,8% "

pH después de esterilizar 6,8

25

El medio nutritivo para el inóculo vegetativo (300 ml) se introduce en recipientes esterilizables, de fondo plano, con capacidad de 1 litro, y se esteriliza durante 45 minutos a 121°C. La glucosa se esteriliza por separado mediante el método de "tindalización" (descrito por Eugen W. Nester y otros en "Microbiology, molecules, microbes and man" Nueva York, 1973, pág. 8), y se agrega asepticamente, al medio esterilizado.

30

1 El medio nutritivo para el cultivo en fermentadores se produce y se esteriliza por tandas en el fermentador durante 45 minutos a 121°C. El cultivo se realiza en fermentadores de acero inoxidable. Se agita a razón de 150  
5 r.p.m., se airea a razón de 0,5 litro por litro por minuto y a una temperatura de incubación de 20 a 30°C. Se aplica un "impacto anaeróbico" (para inhibir la lisis prematura de las células), interrumpiendo la aireación durante 3 a 6 horas en la duodécima hora del cultivo sumergido. La duración de  
10 la interrupción de aireación se determina mediante un analizador de oxígeno. El cultivo se puede llevar a cabo sin lisis prematura de las células y sin el empleo del anteriormente citado "impacto anaeróbico" si el pH del medio de cultivo se regula, durante el cultivo, sin dejarlo bajar de  
15 6,3. La formación de las esporas, con liberación de cristales de endotoxina, está completa después de 35 a 40 horas de cultivo.

(B) La separación y purificación

20 La separación de las esporas y la endotoxina cristalina, de la exotoxina, se efectúa después de la descomposición total de las bacterias, con liberación de las esporas y de los cristales de endotoxina. La exotoxina hidrosoluble se separa con preferencia por dialisis. Se obtiene de esta manera una mezcla de esporas y endotoxina cristalina, que no es tóxica para los mamíferos. La presencia o  
25 ausencia de exotoxina hidrosoluble se determina mediante el ensayo biológico descrito por Bond y otros. Se produce un medio nutritivo para el ensayo biológico, calentando una  
30 mezcla de 10 g de agar pulverulento, 500 ml de leche fresca, y 7 g de levadura. Una muestra de 10 ml se transfiere

1 a un platillo de Petri de 9 cm, que ya contiene 250 micro-  
litros de la solución de ensayo. En cuanto se ha solidifica  
do el gel, se agregan 20 huevos de mosca doméstica. Los pla-  
tillos se mantienen durante 48 horas en una incubadora a 30°C  
5 Se observa la formación de larvas y la perturbación del gel  
de agar; (R.P.M. Bond, C.B.C. Boyce y S.J. French, Biochem.  
J., vol. 114, páginas 477 a 488, 1969). El producto obteni-  
do, que se libera de la exotoxina hidrosoluble, se puede  
10 someter a tratamientos adicionales y utilizar de manera nor-  
mal para producir insecticidas.

C El secado

El secado se puede llevar a cabo mediante uno  
de los siguientes métodos:

15 Mezclando con arcilla bentonítica la mezcla ob-  
tenida, que contiene esporas y cristales de endotoxina, e  
introduciendo la mezcla en forma de película delgada en una  
secadora aireada, con placas a una temperatura de 40 a 45°C  
aproximadamente.

20 Suspendiendo en agua la mezcla obtenida, y se-  
cando la suspensión en secadoras rotativas o neumáticas.

Secando por pulverización en una secadora apro-  
piada, la mezcla obtenida.

(D) La pulverización y el cribado

25 Si el secado se realiza por pulverización, no  
es preciso reducir más el producto así obtenido. Cuando se  
seca sobre placas en una secadora aireada, el producto se  
pulveriza en un aparato tipo "Alpina" y se hace pasar por  
una criba de malla 180, por lo menos.

(E) La determinación de la actividad

30 La actividad se determinó mediante los siguien

1 tes métodos: contando las esporas vivas, presentes, median-  
te el método de la placa, y efectuando experimentos biológi-  
cos con insectos.

5 Los productos obtenidos se normalizaron de  
acuerdo con las especificaciones y mediciones normalizadas  
de los laboratorios franceses "Lutte Biologique et de Bio-  
cinétique de la Minière (I.N.R.A.).

10 Los siguientes ejemplos se ofrecen, a título  
ilustrativo solamente, para facilitar la interpretación de  
la presente invención.

Ejemplo I

15 Partiendo del cultivo de *Bacillus thuringien-*  
*sis*, variedad Berliner ATCC nº 10.792, el cultivo se reali-  
zó en un medio líquido aireado (el ya descrito Medio I) de  
acuerdo con el método arriba descrito. Durante el cultivo  
sumergido, la temperatura de incubación era de 28°C aproxi-  
madamente. El cultivo se agitó a razón de 150 r.p.m., y la  
aireación se interrumpió durante 3 a 6 horas en las horas  
duodécima a décimocuarta del cultivo. El momento oportuno  
20 para interrumpir la aireación se determinó mediante un apa-  
rato analizador del oxígeno; la aireación se interrumpió  
tan pronto como bajó el consumo y la solubilidad porcentual  
del oxígeno, y el pH bajó a 5,8 aproximadamente. Después de  
3 a 6 horas se reinició la aireación al mismo régimen de  
25 medio litro por litro por minuto. El cultivo sin lisis prema-  
tura se puede realizar, sin biosíntesis anaeróbica, si el  
pH del medio de cultivo se mantiene en la gama de 6,3 a 6,5  
El cultivo sumergido se hace continuar hasta la liberación  
de las esporas y de la endotoxina cristalina al medio un pro-  
30 medio de 35 a 40 horas). El medio de cultivo se introduce

1 entonces en el recipiente en el que se efectua la purifica-  
ción, es decir la separación de la exotoxina hidrosoluble.  
La purificación se lleva a cabo mediante diálisis. Para el  
fin se puede emplear un dispositivo como el representado en  
5 la figura adjunta.

Este aparato comprende un contenedor A para el  
líquido a dializar (a), y agitador (e); el extremo inferior  
del contenedor esté cerrado por una membrana semi-permeable  
a. El contenedor A está parcialmente sumergido en el baño  
10 B, por el cual pasa el agua de diálisis (b).

El medio de cultivo se transfiere del fermenta-  
dor al contenedor A, provisto del agitador e y de la membra-  
na de diálisis a. La membrana puede ser de tipo coloidal o  
de cualquier otro tipo empleado normalmente. La diálisis  
15 es más rápida si se introduce agua desionizada (b) en el con-  
tendor B. La presencia o ausencia de exotoxina hidrosoluble  
se determina mediante el ya descrito ensayo biológico. A la  
mezcla de esporas y endotoxina cristalina así obtenida, se  
agrega un material de carga pulverulento, y la mezcla se se-  
ca sobre placas en un horno de secado. El producto así obte-  
nido se pulveriza y se criba en un aparato tipo Alpina para  
20 obtener un polvo fino.

Ejemplo 2.

El procedimiento se realiza como en el Ejemplo  
25 1º, excepto que el medio nutritivo II (ya descrito) se usa  
para el cultivo sumergido en el fermentador.

Ejemplo 3.

El procedimiento se realiza como en el ejemplo  
30 1º, pero después del cultivo sumergido de las bacterias, y  
después de separar por diálisis la exotoxina, el producto

1 así obtenido se seca en una secadora centrífuga y seguidamente se pulveriza en un aparato tipo Alpina.

Ejemplo 4.

5 El procedimiento se realizó como en el ejemplo 1º, pero después del cultivo sumergido y tras separar la exotoxina por diálisis, el producto se suspendió y la suspensión se secó por pulverización.

10 La temperatura en la secadora era de 90 a 100°C. Para este secado, lo mejor es emplear secadoras con discos que giran de 10.000 a 15.000 r.p.m.. El producto es un polvo muy fino que se puede usar tal cual, sin reducirlo ni cribarlo. Este producto final no contiene exotoxina.

15 La presente invención puede emplearse también para cultivar variantes del mismo tipo de bacteria, p. Ej. *Bacillus thuringiensis* variante sotto, nº 117 C de la Colección japonesa, y *Bacillus thuringiensis* var. *subtoxicus*. Todas estas bacterias se describen detalladamente en la literatura.

20 Una ventaja de la presente invención es la mayor actividad del producto obtenido y su excelente pureza, es decir su falta de exotoxina; además el rendimiento de esporas y endotoxina es elevado.

25 La actividad insecticida del componente activo, que comprende las esporas del *Bacillus thuringiensis* y la endotoxina cristalina se puede definir de dos maneras:

- como el número de esporas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* en un gramo del componente activo y
- como unidades internacionales (UI).

30 El componente activo, que forma parte de las presentes preparaciones, tiene la siguiente actividad:

1

$10^{10}$  esporas por gramo de componente activo  
6000 y 15.000 UI por mg de componente activo.

5

100 UI/mg es el valor del producto que indica la misma actividad insecticida que una muestra normalizada E-61 (una mezcla de esporas y cristales de endotoxina del *Bacillus thuringiensis*, ensayada en el insecto *Ephestia Kühniella*).

Con el componente activo se obtienen las siguientes preparaciones:

10

Preparación pulverulenta "Bactucide-P"

4% del componente activo 15.000 UI/mg

25% de Aerosil (Vesalon)

5% de Jugopon

66% de caolín

15

Preparación líquida "BACTUCIDE-S"

8,0% del componente activo 6.000 UI/mg.

1,0% de carboximetilcelulosa

0,3% de emulsor

3,0% nafta-hidrocarburo

20

87,7% de agua

pH 6,8-7,2

Preparación de gránulos "BACTUCIDE-S"

98,0% de gránulos (carbonato de calcio)

2,0% del componente activo ( $2,4 \cdot 10^9$  esporas/g)

25

El insecticida biológico "BACTUCIDE" se usa especialmente contra insectos del grupo de los lepidópteros.

30

La preparación "BACTUCIDE" líquida se aplica a razón de 0,8 a 1,5 litros por hectárea, diluyendola con 500 a 1.000 litros de agua. La dilución depende del modo de aplicación, de la cantidad de insecto, y de lo tupido de la

1 vegetación. El producto se puede aplicar también desde el  
aire.

5 La preparación "BACTUCIDE" pulverulenta se  
aplica de la misma forma que la preparación líquida, a  
razón de 0,6-1,0 kg por hectárea.

La preparación "BACTUCIDE" granulada se emplea  
exclusivamente contra el insecto *Pyrausta nubilalis* (maíz)  
a razón de 30 kg por hectárea.

10 El "BACTUCIDE" es fácilmente mezclable con in-  
secticidas químicas y es compatible con éstos. A título de  
ejemplo, se pueden preparar las siguientes mezclas de in-  
secticidas químicos con el insecticida biológico "BACTUCIDE".

un 0,2% de "Malathion" con un 0,12% de BACTU-  
CIDE.

15 un 0,1-0,2% de "Dimethoat" con un 0,15% de  
BACTUCIDE.

un 0,1-0,2% de "Servin" con un 0,15% de BACTU-  
CIDE.

20 Se puede obtener los mismos efectos con menores  
concentraciones del insecticida químico, con menor toxici-  
dad. También otros insecticidas químicos son compatibles con  
el BACTUCIDE, por ejemplo el Metilparathion, el Diazunon,  
el DDT, el Pyrethrum, el Phosdrin, etc.,.

25 Se han efectuado ensayos con 50 insectos, apro-  
ximadamente. En las siguientes tablas se consignan insectos  
sensibles al BACTUCIDE y los resultados obtenidos con algu-  
nos importantes de ellos.

Actividad de la preparación líquida "BACTUCIDE-S" con respec-  
to a algunos insectos importantes.

30

1

TABLA I

Actividad del BACTUCIDE contra el insecto Trychoplusia ni  
(en la col)

5

litros por ha	porcentaje de larvas destruidas			total de larvas empleadas
	en días			
	1-5	5-7	10	
0,2	20	27	90	180
0,5	63	80	112	220
1,0	75	92	200	222
testigo	--	--	--	650

10

TABLA II

Actividad del BACTUCIDE contra el insecto Hyponomeuta mali-  
nellus  
(en manzanos)

15

litros por ha	insectario		ensayos en la huerta	
	% de mortalidad	corr. mort.	% de mortalidad	corr. mort.
0,4	15	13,8	12	11,05
0,6	32	31,2	31	30,2
1,0	85	84,2	86,0	85,2
1,5	100	100	100	100

20

TABLA III

Actividad del BACTUCIDE contra el insecto Heliothis virescens  
y el Heliothis zea (en tabaco y algodón)

25

litros por ha	días	algodón	tabaco
		% de mortalidad	% de mortalidad
0,2	4	30	75
0,5	6	50	100
1,0	8	95	100
1,5	10	100	

30

1

TABLA IV

Actividad del BACTUCIDE-G granulado contra el insecto Pyrausta nubilalis (en el maíz)

5

kg/ha	número de plantas	% de plantas con larvas vivientes	promedio de larvas por planta	eficacia porcentual del BACTUCIDE-G
30	80	41,0	0,9	82

En resumen la patente de introducción que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

10

REIVINDICACIONES

15

1. Un procedimiento para preparar un insecticida microbiano que contiene esporas y endotoxina cristalina, cultivando el microorganismo *Bacillus thuringiensis* en un medio nutritivo hasta haberse efectuado la formación de las esporas, seguida de la elaboración del insecticida; caracterizado porque se interrumpe la etapa de aireación del medio nutritivo durante el cultivo, durante tres horas por lo menos, o se mantiene el pH del medio nutritivo aireado durante el cultivo entre 6,3 y 7, con preferencia en 6,3 a 6,5.

20

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque durante su elaboración el insecticida microbiano se libera por diálisis de la exotoxina hidrosoluble tóxica.

25

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque el material que contiene las esporas y la endotoxina cristalina se libera de la exotoxina tóxica mediante diálisis a través de una membrana semi-permeable.

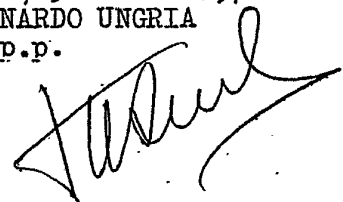
30

4. Se reivindica por último como objeto sobre

1 el que ha de recaer la Patente de Introducción que se solli-  
cita: UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN INSECTICIDA MICRO-  
BIANO.

5 Todo conforme queda descrito y reivindicado en  
la presente memoria descriptiva que consta de dieciseis  
páginas mecanografiadas y dibujos que se acompañan.

Madrid, 3 Enero 1.978  
BERNARDO UNGRIA  
p.p.



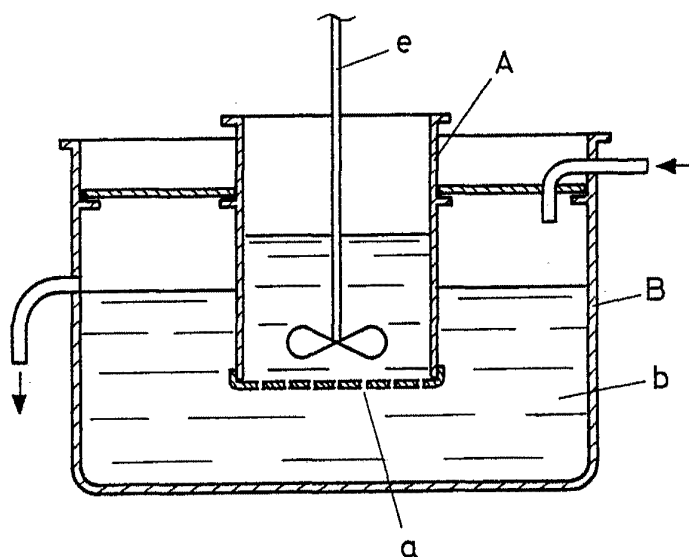
10

15

20

25

30



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 3 Enero 1.978  
BERNARDO UNGRIA  
P.P.