

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 658**

51 Int. Cl.:
A01N 41/12 (2006.01)
A01N 41/10 (2006.01)
A01N 25/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02718237 .7**
96 Fecha de presentación: **04.03.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1370137**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.12.2003**

54 Título: **TRATAMIENTO PESTICIDA DE SUELOS O DE SUSTRATOS CON COMPUESTOS AZUFRADOS.**

30 Prioridad:
19.03.2001 FR 0103674

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.12.2011

73 Titular/es:
**ARKEMA FRANCE
420, RUE D'ESTIENNE D'ORVES
92700 COLOMBES, FR**

72 Inventor/es:
**AUBERT, Thierry y
AUGER, Jacques**

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 369 658 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento pesticida de suelos o de sustratos con compuestos azufrados.

La presente invención se refiere al campo de la agricultura y tiene más particularmente por objeto la sustitución del bromuro de metilo en todos sus usos de tratamiento de suelos o de sustratos de plantas (mantillos, turbas, lana de roca, etc.), en particular los destinados a la agricultura, con vistas a controlar en los mismos los nemátodos, hongos patógenos, insectos dañinos y bacterias.

Actualmente, la desinfección de los suelos o de los sustratos, por ejemplo los destinados a la agricultura intensiva y en particular destinados a la arboricultura, al cultivo de hortalizas y a la horticultura, se efectúa mayoritariamente mediante fumigación con bromuro de metilo (consumo mundial superior a 70.000 toneladas), presentando este compuesto en el estado gaseoso excelentes propiedades nematicida, fungicida, insecticida y bactericida. Desafortunadamente, este compuesto contribuye al empobrecimiento de la capa de ozono y, según el acuerdo de Montreal (1992), ya no deberá ser utilizado en 2005 en los países industrializados. Aparece por lo tanto una necesidad urgente de proponer a los usuarios unos sustitutos tan eficaces y lo más respetuosos posible para el medioambiente. A pesar de los esfuerzos continuos realizados tanto por las organizaciones gubernamentales como por los organismos privados, no se ha encontrado en la actualidad ningún sustituto capaz, por sí mismo y con el mismo coste, de sustituir el bromuro de metilo en todos sus usos con la misma eficacia (véase USDA Report, Vol. 6, nº 4 y Citrus & Vegetable Magazine, Methyl bromide Update: Spring 2000)). En efecto, los principales sustitutos propuestos actualmente son muy tóxicos y necesitan por lo tanto una protección respiratoria cara y poco cómoda (caso del dicloropropeno) o bien son delicados de aplicar y conducen por lo tanto a unos resultados variables (caso del metam-sodio, del Dazomet y del tetratiocarbonato), o bien son claramente más costosos (caso del yoduro de metilo).

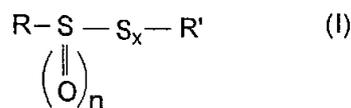
Según les consta a los inventores, los únicos compuestos azufrados previstos como sustitutos del bromuro de metilo son el isotiocianato de metilo (MITC), el tetrahidrocarbonato o unos compuestos generadores de MITC tales como el metam-sodio y el dazomet.

A pesar de los esfuerzos considerables realizados por la comunidad científica desde la prohibición del bromuro de metilo, se han encontrado pocas moléculas capaces de sustituirlo en su aplicación en fumigación de los suelos o de los sustratos mientras que existen centenares de pesticidas disponibles (más de 700 nematicidas, fungicidas, insecticidas, bactericidas catalogados en el Pesticide Manual, Tenth edition, Ed. Clive Tombin). La razón es la necesidad para los fumigantes de cumplir dos condiciones esenciales: por un lado, no deben presentar, a las dosis a las que son activos, ninguna fitotoxicidad sobre los cultivos implementados después del tratamiento y, por otro lado, deben tener la propiedad esencial y rara de no ser completamente absorbidos en los suelos y de difundirse rápidamente, en forma de gas, en el espesor del suelo a tratar, encontrándose los organismos patógenos a menudo hasta 50 centímetros por lo menos por debajo de la superficie del suelo; además, por razones evidentes de productividad, así como para limitar el riesgo de reinfestación, el tiempo de tratamiento durante el cual el fumigante actúa debe ser el más corto posible.

Se encuentran en la bibliografía algunas indicaciones dispersas sobre la actividad específica de ciertas sustancias azufradas frente a diversos organismos patógenos: es el caso, por ejemplo, de los disulfuros que impiden que las larvas de nemátodos salgan de los quistes (patente GB 249 830) o que actúen sobre los insectos de tipo coleópteros o lepidópteros presentes en los productos almacenados (Pestic. Sci. Vol. 55, 1999, páginas 200-202); los dialilsulfuros tienen una acción fungicida sobre los esclerotes de *S. Cepivorum* (Soil Biology and Biochemistry, Vol. 14, nº 3, páginas 229-232); las propiedades nematicidas de disulfuros o trisulfuros derivados de ciertos alliums sobre los nemátodos de tipo *Meloidogyne incognita* se describen en el artículo Agric. Biol. chem. 52 (9) 1988, páginas 2383-2385. Los tiosulfatos ($n = x = 1$) se describen en la bibliografía como nematicidas (JP 01 207 204), como fungicidas y antibacterianos (JP 57 075 906), como nematicidas y antimicrobianos (Agric. Biol. Chem., 1988, 52(9), páginas 2383-2385), como insecticidas contra los insectos de los productos almacenados (Pestic. Sci. Vol. 55, 1999, páginas 200-202). La actividad insecticida de los vapores procedentes de triturados de allium que contienen entre otros unos disulfuros y unos tiosulfatos ha sido demostrada en la solicitud de patente FR-A-2 779 615 que propone la utilización de estos triturados para el tratamiento mediante fumigación de los productos almacenados. Sin embargo, para el experto en la materia, no es evidente *a priori* que un fumigante para productos almacenados pueda convenir para la aplicación como tratamiento de suelos o de sustratos. En efecto, tal como se explica en la columna 3 (línea 8-54) de la patente US nº 5.518.692, que preconiza el yoduro de metilo como sustituyente al bromuro de metilo, el suelo es un medio mucho más complejo que los productos almacenados (humedad no uniforme, partículas de diámetros muy variables, etc.) y los organismos a controlar son mucho más numerosos y variados en el caso de suelos. En consecuencia, la mayoría de los fumigantes utilizados para los productos almacenados no se utilizan para la fumigación de los suelos.

No se encuentra en la técnica anterior ninguna indicación de una actividad pesticida global de estas sustancias, es decir una actividad simultánea nematicida, fungicida, insecticida y bactericida. La actividad nematicida, fungicida y bactericida de los dimetilpolisulfuros (que tienen un número de átomos de azufre mayor o igual a 3) se describe en la patente US nº 2.917.429, pero no se menciona ninguna propiedad insecticida, y se remite al dimetilsulfuro porque tiene una actividad nula frente a un gran número de hongos.

Se ha descubierto ahora que los compuestos azufrados de fórmula general:



5 en la que R representa un radical alquilo o alquenoilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, n es igual a 0, 1 ó 2, x es un número comprendido entre 0 y 4, y R' representa un radical alquilo o alquenoilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono o, sólo si n = x = 0, un átomo de hidrógeno o de metal alcalino, son particularmente interesantes para la fumigación de suelos y sustratos porque cumplen las tres condiciones esenciales para poder ser utilizados prácticamente como desinfección de suelos o sustratos: presentan unas propiedades pesticidas globales (nematicidas, fungicidas, insecticidas, bactericidas); son capaces de difundirse rápidamente en la capa de suelo a 10 tratar para conducir a una concentración en gas suficiente para matar los organismos patógenos presentes; a las dosis necesarias para matar estos organismos patógenos, los compuestos de fórmula (I) no presentan ninguna toxicidad sobre los cultivos cultivados después del tratamiento. Este conjunto de propiedades indispensables para la aplicación prevista no había sido descrito nunca antes para los compuestos de fórmula (I).

15 Como sustitutos al bromuro de metilo, los compuestos de fórmula (I) son aún más interesantes que algunos ya están presentes en la naturaleza procedentes de la degradación natural de las crucíferas y de los alliums. En particular, los tiosulfatos, incluidos en la fórmula general (I), son unos productos emitidos naturalmente cuando se trituran unos alliums y, a este respecto, pueden ser utilizados en agricultura biológica. Por otra parte, puesto que no contienen átomos de halógeno generadores de radicales halogenados responsables de la destrucción catalítica del ozono estratosférico, los compuestos de fórmula (I) no suponen ningún peligro para la capa de ozono.

20 Como ejemplos no limitativos de radicales R y R', se pueden citar los radicales metilo, propilo, alilo y 1-propenilo. Entre los compuestos de fórmula (I), se prefieren los compuestos para los cuales n = 0. Otros compuestos preferidos son los disulfuros (n = 0, x = 1) y más particularmente el dimetildisulfuro (DMDS).

25 Sin embargo, forma parte de la invención tal como se reivindica únicamente el tratamiento pesticida de suelos o sustratos de plantas mediante fumigación, con efecto acumulativo, nematicida, fungicida, insecticida y bactericida, caracterizado porque se aplica en el suelo o en el sustrato, a una dosis comprendida entre 150 y 1.000 kg/ha al menos un compuesto azufrado que es el dimetildisulfuro.

Los compuestos de fórmula (I) se pueden utilizar en estado puro o en diversas formas que, según la naturaleza del compuesto (I), puede ser una emulsión acuosa, una microemulsión, un producto microencapsulado o soportado por un sólido, una disolución en agua, en un disolvente orgánico o en mezcla con un producto que puede tener a su vez una actividad para el tratamiento de suelos.

30 Todas estas formulaciones se pueden realizar según unos métodos bien conocidos por el experto en la materia. Así, por ejemplo, las emulsiones acuosas y las microemulsiones se pueden obtener añadiendo uno o varios tensioactivos al compuesto de fórmula (I), y después añadiendo a la mezcla obtenida una cierta cantidad de agua de manera que se obtenga una emulsión estable o una microemulsión.

35 Están más particularmente adaptados a la preparación de emulsiones acuosas o microemulsiones los tensioactivos más bien hidrófilos, es decir los que tienen un HLB ("Hydrophile Lipophile Balance") mayor o igual a 8, que pueden ser de naturaleza aniónica, catiónica, no iónica o anfótera. Como ejemplos no limitativos de tensioactivos aniónicos, se pueden citar:

40 - las sales de metal alcalino, alcalinotérreo, de amonio o de trietanolamina de los ácidos alquil-, aril- o alquilaril-sulfónicos, ácidos grasos de pH básico, ácido sulfosuccínico o ésteres alquílicos, dialquílicos, alquilarílicos o polioxietilen-alquilarílicos del ácido sulfosuccínico,

- las sales de metal alcalino o alcalinotérreo de los ésteres de ácido sulfúrico, fosfórico, fosfónico o sulfoacético y de alcoholes grasos saturados o insaturados, así como sus derivados alcoxilados,

- las sales de metal alcalino, o alcalinotérreo de los ácidos alquil-aril-sulfúricos, alqui-aril-fosfóricos, alquil-aril-sulfoacéticos, así como sus derivados alcoxilados.

45 Los tensioactivos catiónicos que se pueden utilizar son, por ejemplo, los de la familia de los alquil-amonio cuaternarios, de los sulfonios o de las aminas grasas de pH ácido, así como sus derivados alcoxilados.

Como ejemplos no limitativos de tensioactivos no iónicos, se pueden citar los alquil-fenol alcoxilados, los alcoholes alcoxilados, los ácidos grasos alcoxilados, los ésteres grasos de glicerol o los derivados del azúcar.

Los tensioactivos anfóteros que se pueden utilizar son, por ejemplo, las alquil-betaínas o las alquil-taurinas.

50 Los tensioactivos preferidos para la preparación de las emulsiones acuosas y microemulsiones son los compuestos

a base de alquil-benceno sulfonato y de alquil-fenol alcoxilado.

Los disolventes orgánicos que se pueden utilizar para disolver los compuestos de fórmula (I) según la invención son los hidrocarburos, los alcoholes, los éteres, las cetonas, los ésteres, los disolventes halogenados, los aceites minerales, los aceites naturales y sus derivados, así como los disolventes polares apróticos tales como la dimetilformamida, el dimetilsulfóxido o la N-metilpirrolidona. Convienen particularmente bien los disolventes biodegradables, más particularmente los ésteres metílicos de los aceites de colza.

Los productos con actividad pesticida particularmente adaptados para ser mezclados con los compuestos de fórmula (I) según la invención son unos productos puros tales como el 1,3-dicloropropeno o a cloropicrina ($\text{Cl}_3\text{C-NO}_2$), utilizados a su vez como fumigantes, las disoluciones acuosas de productos tales como el Metam-sodio ($\text{CH}_3\text{-NH-CS}_2\text{Na}^+$) o el tetratiocarbonato de sodio (Na_2CS_4) utilizados asimismo como fumigantes, o cualquier otro producto que tenga una actividad complementaria o sinérgica con los compuestos de fórmula (I), tal como el MITC ($\text{CH}_3\text{-NCS}$) o el Dazomet (generador de MITC).

Los compuestos de fórmula (I) y las composiciones que los contienen pueden ser aplicados según cualquiera de los métodos clásicos de introducción de pesticidas en el suelo, tal como por ejemplo la inyección mediante cuchillas de arado que permite introducir el producto en profundidad, la pulverización sobre el suelo, el gota a gota mediante un sistema de irrigación clásico o la aspersión de tipo "sprinkler". Después de la introducción del producto en el suelo y de una eventual repartición (por ejemplo mediante una roto-laya en el caso de una inyección en el suelo), la superficie del suelo se puede eventualmente "cerrar" o bien mediante un glaseado de la superficie por medio de un rodillo alisador, o bien mediante una película plástica.

Las dosis de compuesto (I) a utilizar para obtener el efecto deseado se sitúan generalmente entre 150 y 1.000 kg/ha y dependen de la naturaleza del compuesto (I), del nivel de infestación del suelo, de la naturaleza de los devastadores y de los organismos patógenos, del tipo de cultivo y del suelo, y de los métodos de aplicación. A estas dosis, se observa el efecto pesticida general buscado (al mismo tiempo nematocida, fungicida, insecticida y bactericida) y ningún efecto fitotóxico.

No se aparta del ámbito de la presente invención si se asocia el tratamiento DMDS con un tratamiento (simultáneo o no) con una o varias sustancias pesticidas distintas.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

EJEMPLO 1 (formulaciones)

Ejemplo 1a: unas emulsiones acuosas que tienen una estabilidad suficiente para permitir una aplicación homogénea del producto en el suelo después de la preparación de la emulsión se pueden obtener mezclando:

- 692 g de dimetildisulfuro, 38,5 g de Toximul[®] D, 38,5 g de Toximul[®] H (2 tensioactivos comercializados por la compañía Stepan, a base de alquil-benzen-sulfonato y de alquilfenol alcoxilado en disolución alcohólica), y 9.230 g de agua: formulación A.

- 1.800 g de dimetildisulfuro, 160 g de Toximul[®] DH68, 40 g de Toximul[®] DM83 (2 tensioactivos comercializados por la compañía Stepan, a base de alquil-benzen-sulfonato), y 8.000 g de agua: formulación B.

- 1.600 g de dimetildisulfuro, 320 g de Toximul[®] DH68, 80 g de Toximul[®] DM83 (2 tensioactivos comercializados por la compañía Stepan, a base de alqui-benzen-sulfonato), y 8.000 g de agua: formulación C.

Ejemplo 1b: una microemulsión agua-dimetildisulfuro se puede preparar añadiendo 4.400 g de agua a una mezcla de 4.400 g de dimetildisulfuro, 960 g de Toximul[®] DH68 y 240 g de Toximul[®] DM83 (2 tensioactivos comercializados por la compañía Stepan, a base de alqui-benzen-sulfonato): formulación D.

Ejemplo 1c: una disolución de dimetildisulfuro en éster metílico de colza, disolvente biodegradable que permite aumentar el punto de destello de la preparación a aplicar y por lo tanto mejorar la seguridad del aplicador, se puede obtener disolviendo 3.000 g de dimetildisulfuro en 7.000 g de éster metílico de colza: formulación E.

EJEMPLO 2 (fitotoxicidad)

Ejemplo 2a:

La ausencia de fitotoxicidad del dimetildisulfuro (DMDS) aplicado en forma de la formulación A, en el intervalo de dosis en el que es eficaz sobre los organismos patógenos del suelo, ha sido demostrada sobre plantas jóvenes de pepinos (9 cm, 2 hojas, híbrido ARIS) y de tomates (13 cm, 3 hojas, híbrido JUMBO):

Para los dos tipos de cultivo, se han realizado 4 tratamientos sobre 20 plantones:

- control no tratado

- 360 kg/ha de DMDS
- 540 kg/ha de DMDS
- 720 kg/ha de DMDS

5 Cinco días después del tratamiento, los plantones jóvenes son transplantados en macetas de 20 cm de diámetro y 35 cm de altura.

Las observaciones referentes al número de hojas por plantón y el estado visual de los plantones se realizan 15 y 41 días después de la transplatación:

Tabla 1: número medio de hojas por plantón

Tratamiento	Tomate		Pepino	
	después de 15 días	después de 41 días	después de 15 días	después de 41 días
Control no tratado	5,5	9,7	5,4	9,8
DMDS: 360 kg/ha	5,3	9,6	5,3	9,8
DMDS: 540 kg/ha	5,3	9,4	5,7	9,7
DMDS: 720 kg/ha	5,7	9,8	5,7	9,9

10 Los resultados de la tabla 1 muestran que no hay ninguna diferencia significativa entre el control no tratado y los plantones tratados con DMDS, sea cual sea la concentración ensayada; además no se ha detectado ningún síntoma visual de fitotoxicidad.

Ejemplo 2b: Ausencia de fitotoxicidad del DMDS sobre la lechuga, aplicado a 150 kg/ha, en pleno campo, en un invernadero.

1. Material y métodos

15 Variedad de lechuga: Sprintia

Tratamiento: El DMDS se aplica en forma de la formulación A con la ayuda de un pulverizador de chorro, y después se incorpora en una profundidad de aproximadamente 5 cm con una fresa rotativa. El suelo se cubre a continuación con una lona de polietileno negra.

Plantación: 7 días después del tratamiento, en una cantidad de 160.000 pies/ha.

20 Recolección: 2 meses y 20 días después de la plantación.

2. Resultados

25 Unas observaciones visuales sobre el terreno 1 y 2 meses después de la plantación no han revelado ninguna señal de fitotoxicidad. En la recolección, el peso medio de las lechugas tratadas con DMDS ha sido medido y encontrado igual a 505 g, en comparación con 490 g para el control sin tratamiento. Por lo tanto, se puede concluir que el tratamiento efectuado con DMDS no tiene ningún efecto fitotóxico sobre la lechuga.

EJEMPLO 3 (DIFUSIÓN EN EL SUELO)

30 La velocidad de difusión del DMDS ha sido estudiada llenando un recinto hermético de pirex de 3,3 litros y de 40 cm de altura con 2,5 litros de tierra (es decir 33 cm) procediendo del valle de la Garonne (suelo areno-lodoso que contiene 1,6% de materia orgánica); se ha depositado el DMDS en la superficie de la tierra en 2 dosis: 300 y 800 kg/ha, es decir, considerando una desinfección sobre 30 cm, unas dosis de 100 y 266,6 g/m³ de suelo. Se miden a continuación mediante cromatografía en fase gaseosa, en función del tiempo (en horas), las concentraciones en DMDS en forma gaseosa (en g/m³) en el volumen superior del recinto (punto A) así como a 11 cm (punto B), 22 cm (punto C) y 33 cm (punto D) por debajo del nivel de la tierra gracias a 3 aberturas equipadas con septum herméticas por el lado del recinto; se obtiene así la evolución de la concentración en función del tiempo para los 4 puntos de medición, tal como se muestra en la tabla 2 en el caso de la dosis de 800 kg/ha.

Tabla 2: Concentraciones en DMDS en g/m³ - caso de la dosis 800 kg/ha

Tiempo en h	A (0 cm)	B (-11 cm)	C (-22 cm)	D (-33 cm)
0	0	0	0	0
1	144,9	76,6	3	0
3	152,7	73,9	5,1	0,3
5	96,3	63,8	48,4	21,5
5,5	123,7	91,4	58,3	29,4
24	32,7	30,2	40,1	34,4
96	11,8	11,5	12,9	14,6

La tabla 2 muestra que basta con 24 horas aproximadamente para que la concentración en DMDS sea homogénea en todo el grosor de la columna de tierra.

5 El producto CT de las concentraciones C por los tiempos de medición T es otro dato esencial que indica las dosis acumuladas de DMDS a las que están sometidos los organismos patógenos que se encuentran eventualmente en los diferentes puntos de medición. Así, se encuentran, para las dos concentraciones ensayadas, los valores de CT en gh/m^3 indicadas en la tabla 3.

Tabla 3

Dosis	A (0 cm)	B (-11 cm)	C (-22 cm)	D (-33 cm)
300 kg/ha	3187	2737	2753	2210
800 kg/ha	4145	3327	3276	2809

10 Los valores de CT medidos son por lo tanto del orden de 2500 gh/m^3 para una dosis de 300 kg/ha y 3000 gh/m^3 para una dosis de 800 kg/ha.

EJEMPLO 4 (PROPIEDADES FUNGICIDAS)

El efecto fungicida del DMDS ha sido demostrado sobre cuatro de los organismos patógenos comunes y dañinos para los principales cultivos descritos en el artículo “Désinfecter les sols autrement” publicado en junio de 1999 en la revista de CTIFL (Centro técnico interprofesional de frutas y legumbres). Estos cuatro organismos son los siguientes:

15 -> *Phytophthora cactorum*, uno de los representantes más conocidos de la familia de los fitofthora, hongos polífagos que atacan particularmente el tomate, el pimiento y la fresa, representando estos tres cultivos la mayoría del consumo del bromuro de metilo a nivel mundial. *Phytophthora cactorum*, en particular, ataca principalmente la fresa y los árboles frutales.

20 -> *Rhizoctonia solani*: grupo de patógenos polífagos muy importantes en el género de las *rhizoctonia* y que atacan a numerosos cultivos de hortalizas, entre los cuales el pimiento y la lechuga.

-> *Sclerotinia sclerotiorum*: hongo polífago que ataca particularmente los cultivos de melones.

-> *Sclerotium rolfsii*: hongo asimismo polífago que se encuentra por ejemplo en los cultivos de melón y de calabacín.

Estos cuatro hongos han sido estudiados en la forma siguiente:

25 - *Sclerotinia sclerotiorum*: esclerotes

- *Sclerotium rolfsii*: esclerotes

- *Rhizoctonia solani*: granos de cebada colonizados (micelio y esclerotes)

- *Phytophthora cactorum*: granos de mijo colonizados (micelio, esporas y oosporos)

Preparación de los hongos (24h antes de la operación de gaseado)

30 1. Preparación de los esclerotes de *Sclerotinia sclerotiorum* y de *Sclerotium rolfsii*: Los hongos se cultivan en un medio de malta gelosado hasta la obtención de los esclerotes. Los esclerotes se extraen estérilmente y se almacenan en seco en cajas de Petri vacías hasta su utilización. Los esclerotes utilizados para el ensayo tienen más de 3 meses y están perfectamente latentes.

2. Preparación de *Phytophthora cactorum* y de *Rhizoctonia solani*:

35 El mijo y la cebada que sirven para la multiplicación de los dos hongos son humectados con agua ultra pura mediante inmersión durante 24 horas. Los granos se escurren a continuación ligeramente y después se reparten en frascos y se autoclavan (3 autoclavados a 110°C durante 20 minutos, 3 veces con 24 horas de intervalo). Unos fragmentos de cultivo de los hongos son introducidos en los frascos que son incubados a continuación a $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ (luz blanca durante 18h) hasta la obtención de una colonización homogénea. Los granos se retiran después de los frascos estérilmente, se secan con flujo estéril de una campana y después se almacenan en seco hasta su
40 utilización.

Condición de gaseado y de desorción

El conjunto de los lotes de hongos a tratar se dispone durante algunas horas a temperatura del ensayo (20°C). Entre 35 y 300 unidades de hongos o “propágulos” (granos o esclerotes) son sometidos al gaseado durante cada ensayo.

45 Cada recinto de fumigación que comprende una o varias especies de hongos corresponde a un matraz de vidrio hermético al gas de un volumen de 11 litros. Cada matraz está equipado con derivaciones, inferior para la

introducción del DMDS líquido, y superior para la toma de muestra de aire mediante una jeringa.

Antes de la introducción del gas, se efectúa un vacío parcial (-500 mbars) en el matraz con una bomba de vacío. Esto permite, por un lado, evitar el fenómeno de sobrepresión debido a la expansibilidad del DMDS en el matraz y, por otro lado, favorecer una mejor homogeneidad de la mezcla aire-gas en los primeros segundos tras la inyección.

- 5 El DMDS (pesado precisamente al mg) se inyecta con la jeringa por vía líquida a través de la derivación inferior, es decir debajo de la rejilla dispuesta a media altura del matraz y que soporta los lotes de hongos. Después de la introducción del producto, la presión interna del matraz se restablece a presión atmosférica. Un agitador magnético funciona durante todo el tiempo de tratamiento para homogeneizar bien la mezcla aire-gas.

- 10 Al final del gaseado, se retira la tapa del matraz. Un minuto después de esta operación, los lotes de hongos gaseados se retiran y se dejan al aire libre durante 15 minutos para desorción del DMDS. Después, se transvasan en una caja de Petri, permaneciendo ésta abierta durante 5 minutos para permitir una perfecta desorción del gas.

MEDICIÓN DE LAS CONCENTRACIONES EN GAS

- 15 Mediante CPG con detector FID, se mide la concentración media (C en g/m³) de DMDS en el recinto de fumigación después de la homogeneización del gas en el aire del recinto y, teniendo en cuenta la duración de exposición (T en horas) se calcula el producto CT (g.h/m³) que, en el campo de la fumigación, es el parámetro clave a tener en cuenta, puesto que la eficacia biológica de un gas frente a un agente patógeno dado es efectiva sólo si este último ha sido expuesto a cierta concentración media C durante un cierto tiempo de exposición T, es decir a un cierto valor del producto CT, valor (o dosis) que se puede alcanzar de diferentes maneras: bajas concentraciones y larga duración de exposición o la inversa.

- 20 Condiciones de lectura de los resultados

Granos: Después del gaseado, los granos son depositados en un medio selectivo a razón de 5 a 10 por caja de Petri de 90 mm (*Rhizoctonia*: Malta agar; *Phytophthora*: Malta agar + pimaricina, ampicilina, rifampicina, benomil).

- 25 Esclerotes: Después del gaseado, los esclerotes son desinfectados superficialmente con lejía (1% de NaOCl), aclarados dos veces con agua estéril, y después depositados en una cantidad de uno por caja en un medio malta agar-cloramfenicol (200 ppm).

Expresión de los resultados

Se anota diariamente el número de propágulos que dan lugar a una colonia (propágulos viables), hasta que no haya más evolución, y como máximo 19 días después del gaseado.

Los resultados son expresados en:

- 30 -> viabilidad (V), es decir el porcentaje de propágulos viables que han dado lugar a una colonia

-> reducción de viabilidad (Rv) con respecto al control, es decir:

$$R_v = \frac{V_{\text{control}} - V}{V_{\text{control}}} \times 100$$

- 35 -> nota de vigor (Nm): a cada propágulo que ha dado lugar a una colonia, se le atribuye una nota (N) que describe la rapidez de este propágulo para desarrollarse; esta nota, igual a la diferencia entre el número de días total de observación (19 como máximo) y el número de días entre el depósito en caja de Petri y el desarrollo de la colonia, es aún más importante cuanto más próxima está la aparición de la colonia a la fecha de depósito en caja de Petri. Para cada uno de los ensayos, se efectúa a continuación una media (Nm) de las notas atribuidas.

-> reducción de nota de vigor (R_{NM}) con respecto al control, es decir:

$$R_{Nm} = 100 - \frac{Nm}{Nm_{\text{control}}} \times 100$$

- 40 RESULTADOS

1. Eficacia biológica del DMDS sobre *Phytophthora cactorum*

Los resultados reunidos en la tabla 4 muestran claramente que a dosis CT superiores a 2500 gh/m³ aproximadamente, la eficacia fungicida progresa regularmente con la dosis CT: disminución de la viabilidad y de la nota de vigor. La eficacia total (0% de viabilidad) se obtiene en los alrededores de 3500 gh/m³.

Tabla 4: Recapitulativo del conjunto de las lecturas expresadas en términos de viabilidad y de vigor sobre *Phytophthora cactorum* (X = número de granos)

X	C	T	CT	Viabilidad		Vigor	
				V	RV	Nm (en 12 días)	RNm
60	17,46	24	419	91,7	6,8	7,7	15,5
60	26,04	24	625	100	-1,7	8,05	11,9
60	29,29	24	703	100	-1,7	8,3	9,1
60	37,79	24	907	100	-1,7	7,2	21,2
60	15,91	66	1050	95	5,0	5,5	43,1
90	21,24	66	1402	97,8	2,2	6,6	32,2
60	30,96	48	1450	95	3,4	5,4	40,7
90	28,77	66	1899	97,8	2,2	5,6	42,6
90	30,02	66	1981	97,8	2,2	5,3	45,7
60	51,25	48	2460	43,3	55,9	1,7	81,2
300	37,44	66	2471	nm*	nm*	nm*	nm*
90	42,98	66	2837	16,7	83,3	0,6	93,6
300	45,06	66	2974	nm*	nm*	nm*	nm*
90	48,02	66	3169	1,1	98,9	0,05	99,5
300	52,53	66	3467	0	100	0	100

* nm = no medida

2. Eficacia biológica del DMDS sobre *Rhizoctonia solani*

- 5 Los resultados reunidos en la tabla 5 muestran claramente que a dosis CT superiores a 2.000 gh/m³ aproximadamente, la eficacia fungicida progresa regularmente con la dosis CT: disminución de la viabilidad y de la nota de vigor. La eficacia total (0% de viabilidad) se obtiene en los alrededores de 3.500 gh/m³.

Tabla 5: Recapitulativo del conjunto de las lecturas expresadas en términos de viabilidad y de vigor sobre *Rhizoctonia solani* (X = número de granos)

X	C	T	CT	Viabilidad		Vigor	
				V	RV	Nm (en 11 días)	RNm
60	17,46	24	419	100	0	9,0	0
60	26,04	24	625	100	0	8,7	3,1
70	29,29	24	703	100	0	8,3	7,3
70	37,79	24	907	100	0	7,1	21,6
65	15,91	66	1050	89,2	10,8	7,0	22,2
65	21,24	66	1402	96,9	3,1	7,6	15,0
65	30,96	48	1450	98,5	1,5	4,4	51,3
70	28,77	66	1899	84,3	15,7	6,0	33,2
75	30,02	66	1981	94,7	5,3	7,4	17,2
73	51,25	48	2460	11,0	89,0	0,3	96,2
286	37,44	66	2471	24,1	75,9	0,6	92,0
90	42,98	66	2837	2,2	97,8	0,1	98,4
286	45,06	66	2974	9,4	90,6	0,1	98,4
80	48,02	66	3169	1,2	98,8	0,05	99,3
290	52,53	66	3467	0	100	0	100

10

3. Eficacia biológica del DMDS sobre *Sclerotinia sclerotiorum*

- 15 Los resultados reunidos en la tabla 6 siguiente muestran claramente que a dosis CT superiores a 1.000 gh/m³ aproximadamente, la eficacia fungicida progresa regularmente con la dosis CT: disminución de la viabilidad y de la nota de vigor. La eficacia total (0% de viabilidad) se obtiene en los alrededores de 3.500 gh/m³, considerando que el punto CT 3467 es un punto anormal.

Tabla 6: Recapitulativo del conjunto de las lecturas expresadas en términos de viabilidad y de vigor sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (X = número de esclerotes)

X	C	T	CT	Viabilidad		Vigor	
				V	RV	Nm (en 19 días)	RNm
39	17,46	24	419	89,7	-3,0	13,3	-3,6
41	26,04	24	625	87,8	-0,8	12,8	0,1
41	29,29	24	703	85,4	2,0	12,6	2,2
38	37,79	24	907	81,6	6,3	12,0	6,6
67	15,91	66	1050	41,8	56,1	5,1	63,6
62	21,24	66	1402	46,8	50,9	1,3	90,6
47	30,96	48	1450	29,8	65,8	1,0	92,1
64	28,77	66	1899	29,6	68,9	3,6	74,8
54	30,02	66	1981	20,3	78,7	2,7	81,2
41	51,25	48	2460	14,6	83,2	0,7	94,9
170	37,44	66	2471	32,9	67,1	4,6	70,5
64	42,98	66	2837	14,1	85,2	1,8	87,5
170	45,06	66	2974	11,2	88,8	1,6	89,9
64	48,02	66	3169	0	100	0	100
170	52,53	66	3467	32,3	67,7	3,3	79,0

4. Eficacia biológica del DMDS sobre *Sclerotium rolfsii*

Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla 7 siguiente. Para este hongo, se ha observado una ligera degradación de la calidad del inóculo a lo largo del tiempo. Sin embargo, la viabilidad y el vigor están fuertemente afectados a partir de los CT de 900 a 1.000 gh/m³ y la eficacia total se obtiene entre 2.000 y 2.500 gh/m³.

5

Tabla 7: Recapitulativo del conjunto de las lecturas expresadas en términos de viabilidad y de vigor sobre *Sclerotium rolfsii* (X = número de esclerotes)

X	C	T	CT	Viabilidad		Vigor	
				V	RV	Nm (en 19 días)	RNm
44	17,46	24	419	59,1	33,7	5,1	40,9
41	26,04	24	625	53,7	39,8	4,8	44,3
37	29,29	24	703	51,4	42,4	4,4	48,7
37	37,79	24	907	16,2	81,8	1,4	84,2
58	15,91	66	1050	27,6	68,0	2,1	71,1
60	21,24	66	1402	18,3	78,7	1,3	81,8
40	30,96	48	1450	15,0	83,2	0,7	91,8
65	28,77	66	1899	3,1	96,4	0,2	96,8
70	30,02	66	1981	4,3	95,0	0,3	95,1
40	51,25	48	2460	10,0	88,8	0,4	94,7
170	37,44	66	2471	0	100	0	100
90	42,98	66	2837	0	100	0	100
170	45,06	66	2974	0	100	0	100
80	48,02	66	3169	0	100	0	100
170	52,53	66	3467	0	100	0	100

En resumen, para las cuatro especies de hongos estudiados, el DMDS provoca un decrecimiento de la población muy clara a partir de dosis CT comprendidas entre 2.000 y 2.500 gh/m³, incluso en los alrededores de 1.000 gh/m³ en el caso de *Sclerotinia* y *Sclerotium*, y una mortalidad total para unas dosis CT comprendidas entre 3.000 y 3.500 gh/m³, incluso entre 2000 y 2500 gh/m³ para *Sclerotium*.

10

EJEMPLO 5 (PROPIEDADES NEMATICIDAS)

El efecto nematocida del dimetildisulfuro (DMDS), del dipropildisulfuro (DPDS) y del tiosulfato de dialilo (alicina), tres productos principales de la degradación de los alliums, ha sido demostrado mediante unos ensayos *in vitro* realizados sobre larvas de *Meloidogyne arenaria*, una especie entre los nemátodos de las raíces, muy nocivos, extremadamente polífagos y de los más extendidos en el mundo, sobre la mayoría de los cultivos hortícolas, en particular los del tomate y de la fresa que son los cultivos que consumen más bromuro de metilo. Sólo el tratamiento a base de DMDS forma parte de la invención reivindicada.

15

20 Material y métodos

Las larvas jóvenes de segundo estado (estado libre e infestante) se sumergen durante 24 horas en la disolución a ensayar, y después se recuenta el número de larvas paralizadas antes de transferirlas en agua pura durante otras 24 horas. Al final de las 48 horas así transcurridas, se cuentan nuevamente las larvas paralizadas y al día siguiente

las larvas realmente muertas.

5 La cría de nemátodos se ha realizado en plantones de tomates. Los ensayos se han efectuado con unas disoluciones acuosas de DMDS al 0,0001%, 0,1%, 1% y 5% en masa, de DPDS al 1%, 5% y 10% en masa, y de alicina al 0,0003%, 0,0015% y 0,003% en masa, en comparación con un control de agua pura, y se han repetido cinco veces. La actividad ovicida se ha buscado asimismo según estas mismas modalidades, contando el número de eclosiones después de 5 a 20 días siguientes a la exposición a los productos.

Resultados

A una concentración menor que 1%, el DMDS sólo tiene una actividad nematoestática muy baja y ninguna actividad nematicida.

10 A una concentración mayor o igual a 1%, el DMDS y el DPDS presentan una importante actividad nematoestática y nematicida, tal como lo muestran claramente las tablas 8 y 9. Una eficacia total (100% de mortalidad) se obtiene para unas concentraciones mayores o iguales a 1% en el caso del DPDS.

15 La alicina presenta asimismo una actividad nematoestática y nematicida importante a unas concentraciones mucho más bajas, tal como lo muestra la tabla 10. Sin embargo, no se ha buscado en este caso una eficacia total (100% de mortalidad).

Tabla 8: Eficacia del dimetildisulfuro (DMDS) sobre las larvas

Concentración másica (%)	Porcentaje de inmovilidad después de 24h (%)	Porcentaje de inmovilidad después de 48h (%)	Porcentaje de mortalidad después de 72h (%)
O (Control)	8	6	9
1	72	84	80
5	97	98	98

Tabla 9: Eficacia del dipropildisulfuro (DPDS) sobre las larvas

Concentración másica (%)	Porcentaje de inmovilidad después de 24h (%)	Porcentaje de inmovilidad después de 48h (%)	Porcentaje de mortalidad después de 72h (%)
O (Control)	8	7	9
1	89	100	100
5	93	100	100
10	95	100	100

20 Tabla 10: Eficacia de la alicina sobre las larvas

Concentración másica (%)	Porcentaje de inmovilidad después de 24h (%)	Porcentaje de inmovilidad después de 48h (%)	Porcentaje de mortalidad después de 72h (%)
O (Control)	2	10	8
0,0003	7	49	12
0,0015	19	85	45
0,003	49	65	63

Tal como se desprende de las tablas 11 y 12, el DMDS y el DPDS muestran asimismo una actividad ovicida muy importante. En los dos casos, se observa aproximadamente 97% de reducción del número de eclosión el último día de observación.

25 Tabla 11: Eficacia del DMDS sobre los huevos de nemátodos

Concentración másica (%)	Número de eclosiones (acumuladas)			
	J5	J10	J13	J17
O (Control)	141	179	184	184
1	7	7	7	7
5	2	2	5	5
10	0	2	5	5

Tabla 12: Eficacia del DPDS sobre los huevos de nemátodos

Concentración másica (%)	Número de eclosiones (acumuladas)				
	J5	J8	J12	J15	J19
(O) Control	550	810	990	1030	1030
1	117	183	200	200	200
5	67	67	67	67	67
10	33	33	33	33	33

EJEMPLO 6 (PROPIEDADES INSECTICIDAS)

5 La actividad insecticida del dimetildisulfuro (DMDS), del dialildisulfuro (DADS) y del tiosulfinato de dialilo (alicina) se ha demostrado mediante unos ensayos *in vitro* sobre un insecto de suelo, una termita (*Reticulitermes santonensis*). Sólo el tratamiento a base de DMDS pertenece a la invención reivindicada.

Material y métodos

Se ha recogido en el suelo madera muerta infestada de termitas en un terreno ocupado por una colonia. Esta madera muerta sirve de medio de cría. La cría se mantiene a 25°C constante y una alternancia día/noche 12:12.

10 Los insectos son extraídos en una cantidad de 2 soldados por 28 obreros.

Los ensayos se realizan en unos botes de vidrio de un volumen de 3 l herméticamente cerrados y que contienen los insectos.

15 El producto a ensayar se introduce por un orificio de 2 mm de diámetro con la ayuda de una micropipeta y se deposita en un papel filtro (2x5 cm; Whatman nº1) suspendido en el centro del bote en el que migra por capilaridad y se vaporiza rápidamente. El orificio se cierra herméticamente lo más rápidamente posible.

Los botes se disponen durante 24 horas en una estufa en las mismas condiciones de cría.

20 Al cabo de 24 horas, después de algunos instantes de aeración, se efectúa un primer recuento y después los insectos se vuelven a poner en condición de cría durante otras 24 horas. El recuento de la mortalidad se efectúa por lo tanto al cabo de 48 horas. Es este último recuento el que servirá para calcular la CL50 a 24 horas de fumigación, siendo el primero sólo una indicación de la evolución postratamiento. En efecto, numerosos fumigantes tienen un efecto choque "knock-down" que puede hacer pensar en la muerte de insectos que resultan estar vivos al día siguiente después de la recuperación. Cada ensayo se realiza sobre una población de 30 a 50 insectos y se acompaña de un control sin tratamiento. Se realizan varias repeticiones con dosis próximas de la CL50.

Tabla 13: Resultados (método de los Probits)

	DMDS	DADS	Alicina
CL50 en gx24h/m ³	0,095	0,011	0,010

25

Conclusión:

Tal como se ha indicado en la tabla 13, los 3 productos ensayados muestran una excelente actividad insecticida sobre el insecto de suelo utilizado. La actividad del DADS, próxima a la de la alicina, es superior a la del DMDS, que es a su vez comparable con la del bromuro de metilo (0,1 gx24h/m³).

30 EJEMPLO 7 (EFECTO SOBRE LOS MICROORGANISMOS)

El efecto del DMDS, aplicado a 150 kg/ha en forma de la formulación A, sobre los microorganismos del suelo se ha evaluado según los métodos estandarizados siguientes:

- «Recommended tests for assessing the side-effects of pesticides on the soil micro flora», Technical Report Agricultural Research Council Weed Research Organization, 1980 (59).
- 35 - "OECD Guideline for Testing of Chemicals - Soil Micro-organisms: Carbon Mineralization Test", Draft document, Junio de 1996.

El efecto del DMDS sobre los microorganismos del suelo se mide mediante la disminución del oxígeno consumido por estos microorganismos, expresada en mg O₂ por kg de suelo seco por h, 14, 28, 42, y 57 días después del tratamiento (tabla 14).

Tabla 14

	Día 0	Día 14	Día 28	Día 42	Día 57
Control no tratado	11,23	10,18	7,87	9,12	7,30
DMDS 150 kg/ha	9,70	8,74	6,62	8,93	4,90

La tabla 14 muestra una disminución significativa del oxígeno consumido por los microorganismos, atribuida a una reducción de su población.

REIVINDICACIONES

1. Tratamiento pesticida de suelos o sustratos de plantas por fumigación, con efecto acumulativo, nematocida, fungicida, insecticida y bactericida, caracterizado porque se aplica en el suelo o sustrato a una dosis comprendida entre 150 y 1.000 kg/ha al menos un compuesto azufrado que es el dimetildisulfuro.
- 5 2. Tratamiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto azufrado se aplica en estado puro o en forma de una emulsión acuosa, de una microemulsión, de una disolución en agua o en un disolvente orgánico.
3. Tratamiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el compuesto azufrado no tiene ningún efecto fitotóxico.
4. Tratamiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, asociado a un tratamiento simultáneo o no con una o varias sustancias pesticidas distintas.