

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 220**

51 Int. Cl.:

**A01N 25/12** (2006.01)

**A01N 63/04** (2006.01)

**A01N 65/40** (2009.01)

**A01N 59/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2015 PCT/GB2015/000170**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15189542**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2015 E 15739309 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 3110247**

54 Título: **Control de la infestación de artrópodos**

30 Prioridad:

**13.06.2014 GB 201410677**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**19.10.2017**

73 Titular/es:

**EXOSECT LIMITED (100.0%)  
Leylands Business Park  
Colden Common Winchester Hampshire SO21  
1TH, GB**

72 Inventor/es:

**WAKEFIELD, MAUREEN ELIZABETH**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 638 220 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

## Control de la infestación de artrópodos

La presente invención se refiere a un método de control de la infestación de artrópodos, formulaciones para tratar la infestación de artrópodos y usos de los mismos. En particular, la invención se refiere a métodos de control de la infestación de artrópodos en zonas de almacenamiento de productos secos, métodos para la aplicación de formulaciones en forma de polvo seco a artrópodos, formulaciones de polvo seco que comprenden agentes biológicos, partículas de electreto, y partículas de tierra industriales y métodos de producción de tales formulaciones, y usos de los mismos.

Las zonas de almacenamiento de productos secos, tales como silos de grano y cajones de grano donde el grano se almacena inmediatamente después de la cosecha o antes del procesamiento, atraen artrópodos tales como ácaros y escarabajos, particularmente escarabajos. Otras zonas de almacenamiento de productos secos incluyen almacenes, instalaciones de almacenamiento en supermercados, contenedores de barcos, contenedores de carga tales como cajas, cajones de embalaje y contenedores asociados con y/o en trenes, barcos, aviones y vehículos de transporte por carretera. Para los propósitos de la presente invención, los términos "producto seco" y "productos secos" se usan indistintamente y abarcan productos secos, incluyendo granos enteros para siembra o granos enteros para uso como alimento y/o en la fabricación de alimentos procesados, y sitios almacenamiento para la madera y productos hechos de madera. Los granos enteros incluyen aquellos tales como el trigo, el arroz, la cebada y el maíz (a menudo denominados maíz), legumbres, frijoles, lentejas y productos derivados o elaborados con productos secos. Tales productos secos incluyen también alimentos procesados tales como pastas, harinas de grano, cuscús, cereales, hierbas secas, cereales para el desayuno, piensos de ganado doméstico, por ejemplo, cerdos, vacas, ovejas y caballos, sémolas, panes, nueces (nueces molidas, en hojuelas y/o enteras), comida para merienda, tal como productos dulces y salados incluyendo galletas, patatas fritas, crujientes vegetales, pretzels, galletas de queso, obleas secas y similares. La madera incluye madera, tablonés, artículos de madera tales como andamios para edificios, paneles, puertas y marcos de puertas, dinteles, zócalos, tableros duros, madera contrachapada, muebles y similares. Los artrópodos como los insectos, por ejemplo, los escarabajos de almacenamiento de grano, los escarabajos de madera y las polillas, se alimentan de productos secos y son una causa importante de pérdidas económicas para los agricultores y las industrias alimentarias y madereras.

Cuando los productos secos se retiran de las zonas de almacenamiento de productos secos, muchos artrópodos quedan atrás, habitando grietas y hendiduras en paredes, pisos y otras estructuras de soporte tales como pilares y/o estanterías. Los procedimientos convencionales para controlar las infestaciones de artrópodos que dependen del uso de productos químicos aplicados como formulaciones húmedas para vaciar las zonas de almacenamiento de productos secos son eficaces en la medida en que matan artrópodos que entran en contacto con el producto químico aplicado. Sin embargo, las formulaciones químicas húmedas por lo general no entran en grietas y hendiduras habitadas por poblaciones de artrópodos. Tales poblaciones sobreviven a la aplicación de productos químicos que se aplican a las superficies del ambiente circundante y, por lo tanto, son libres de infestar nuevos envíos de productos secos que se depositan en la zona de almacenamiento y se repite el ciclo de infestación de productos con pérdidas económicas concurrentes.

Otros métodos para tratar zonas de almacenamiento de productos secos dependen de la aplicación de niveles relativamente altos de productos químicos artropodocidas en forma de polvo seco. Sin embargo, la eficacia de tales tratamientos disminuye con el tiempo.

Se han utilizado agentes biológicos en la técnica anterior en intentos de controlar infestaciones de diversos tipos de artrópodos en diversos entornos. En particular, ciertas cepas de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Lecanicillium spp.*, han encontrado uso en el control de ciertos artrópodos. Aunque los hongos entomopatógenos son claramente vistos como candidatos para controlar las infestaciones de artrópodos, también es evidente que la mayoría de las cepas de hongos entomopatógenos son inadecuadas como candidatos para el control de las infestaciones de artrópodos en un sinfín de los llamados ambientes de almacenamiento de productos secos en los que el uso efectivo de cepas de hongos sería deseable. A menudo, se ha demostrado que las cepas candidatas de hongos aparentemente apropiadas son incapaces de tolerar los extremos ambientales que a menudo existen en entornos artificiales, tales como zonas de almacenamiento de productos secos u otros entornos en los que se pueden colocar productos alimenticios secos como se ha indicado anteriormente.

Un problema en el uso de agentes biológicos tales como cepas candidatas de hongos entomopatógenos que pueden ser descubiertos en un país y propuestos para uso en un entorno en un país diferente es que tales cepas pueden no tener un buen rendimiento en el nuevo entorno porque no pueden tolerar los extremos de las condiciones que prevalecen en el ambiente en el país en que se van a utilizar. Además, las restricciones reglamentarias pueden ser tan arduas que hacen imposible la importación de una probable cepa candidata y esto puede ir acompañado de dudas sobre la posibilidad de demostrar su probable eficacia en un ambiente exótico.

J C Lord, J. Economic Entomology, vol. 94, no. 2, 1 de abril de 2001, págs. 367-372 describe cómo los polvos desecantes sinergizan los efectos de *Beauveria bassiana*.

Akbar et al, J Economic Entomology, vol. 97, no. 1, 1 de abril de 2004, págs. 273-280 describen cómo la tierra de diatomeas aumenta la eficacia de *Beauveria bassiana* contra ciertos artrópodos.

- 5 Athanassiou and Steenberg, Biological Control, vol. 40, no. 3, 6 de febrero de 2007 describen el efecto insecticida de *Beauveria bassiana* en combinación con tierra de diatomeas.

El documento USP 4,925,663 describe el uso, entre otras cosas, de una formulación en polvo seco que comprende arroz en polvo, y una cierta cepa de un hongo, *Beauveria bassiana*, que tiene una virulencia particular contra las hormigas de fuego, cuando se usa en un ambiente abierto.

- 10 Meikle et al (2007) J. Econ. Entomol. 100: pp 1-10 describe el uso de cera de carnauba como un portador de esporas de *Beauveria bassiana* (cepa Bb05002 que es nativa de Francia) en colmenas para controlar ácaros varroa. El ambiente dentro de la colmena se reporta como que tiene una humedad relativa (RH) desde 40% a 50%, aparentemente a temperaturas de 33°C a 36°C. Parece que el entorno ambiental dentro de la colmena no está sujeto a extremos amplios de RH y temperatura, entre otras cosas porque las abejas regulan activamente la temperatura dentro.

- 15 El documento WO 2006/121350 describe el suministro de ciertos cultivos biológicamente puros de cepas de hongos entomopatógenos, tales como *Beauveria bassiana* para el control de insectos fitopatógenos para su uso contra *Thysanoptera* (trips), *Hemiptera* (mosca blanca) y otros. Las composiciones descritas en el mismo parecen ser aplicadas a las plantas en el campo como una pulverización húmeda. El documento WO 2011/157983 describe el suministro de una cepa de *Beauveria bassiana* que es útil para controlar la infestación de entre otras zonas de almacenamiento de granos empleando una composición seca que consiste en una cera en forma de partículas que transporta esporas o conidios al sitio diana. La composición descrita no contiene mención del uso de porcentajes en peso seco especificados de minerales industriales, partículas de electreto y entomopatógeno en las composiciones reivindicadas en la misma.

- 25 Una ventaja de las formulaciones de la invención es que el efecto del componente de tierra mineral, el componente de partícula de electreto y el componente de entomopatógeno parece ser sinérgico y proporciona un control significativamente mejor sobre los artrópodos de infestación de productos secos que el efecto de cada componente separado cuando se añaden juntos. La sinergia es evidente a partir de los ejemplos adjuntos.

- 30 Otra ventaja de las composiciones de la presente invención es que son más baratas de fabricar que las composiciones de la técnica anterior. Además, las composiciones de la invención no conducen a una acumulación de residuos tóxicos en los sitios de almacenamiento o, de hecho, en productos secos que pueden ser almacenados y/o tratados en el sitio.

- 35 Un objeto de la presente invención es superar o al menos reducir los inconvenientes de los métodos convencionales de tratamiento de zonas de almacenamiento de productos secos para la infestación de artrópodos. Este y otros objetos resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción y ejemplos.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una formulación de polvo seco que comprende:

- i) esporas de un hongo entomopatógeno que tiene actividad contra artrópodos que infestan zonas de almacenamiento de productos secos, donde las esporas están presentes en una cantidad de 2 a 5% p/p de la formulación;
- 40 ii) partículas de un mineral industrial en una cantidad de 80 a 88% p/p de la formulación; y que tiene un diámetro medio de volumen  $\geq 5 \mu\text{m}$ ; y
- iii) partículas de electreto en una cantidad de 10 a 15% p/p de la formulación.

- 45 Preferiblemente, las esporas están presentes en una cantidad de 2-4.5% p/p, las partículas de material industrial están presentes en una cantidad de 82.5 a 87% p/p, y las partículas de electreto están presentes en una cantidad de 11 a 13% p/p de la formulación de polvo seco de la invención. Un ejemplo de una composición de la formulación seca de la invención es aquella en la que las esporas están presentes en 2.12 a 4.167% p/p, las partículas de material industrial están presentes en 83.3 a 85.1% p/p y las partículas de electreto están presentes en 12.5 a 12.80% p/p.

- 50 Las formulaciones de la invención contienen al menos  $1 \times 10^9$  CFU/gramo en peso seco, preferiblemente las esporas están presentes en una cantidad de al menos  $1 \times 10^{10}$  CFU/gramo en peso seco o en una cantidad de al menos  $1 \times 10^{11}$  CFU/gramo en peso seco. Se debe entender que los términos "conidios", "espora" y "CFU" (que representan

la unidad formadora de colonias) se pueden utilizar indistintamente dependiendo del contexto y se refieren a la misma cosa, es decir, esporas viables, conidios viables O CFU viables. La CFU se refiere frecuentemente a valores mostrados como órdenes de magnitud de CFU viables, tales como de  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^{11}$  o superior. El destinatario experto apreciará que en tales órdenes de magnitud la viabilidad de las CFU estará por lo general en el intervalo de 80% a 99% o incluso al 100%.

Las partículas de electreto de uso en la invención tienen por lo general un diámetro medio de volumen de  $\geq 10 \mu\text{m}$ , preferiblemente de 10 a  $40 \mu\text{m}$ , y más preferiblemente de 10 a  $30 \mu\text{m}$ . Se cree que el tamaño de las partículas de electreto debe ser de aproximadamente  $10 \mu\text{m}$  o más para minimizar los potenciales efectos respiratorios negativos para los trabajadores.

Las partículas de mineral industrial son preferiblemente de un diámetro medio de volumen de  $\geq 5 \mu\text{m}$  o más de tamaño, tal como  $10 \mu\text{m}$ . Se cree que el tamaño de las partículas minerales de tierra juega un papel en la inhibición de la respiración en los artrópodos que entran en contacto con ellas. El mineral industrial se puede seleccionar entre cualquier mineral industrial capaz de ser utilizado en la presente invención, tales como arcillas, tierra de diatomeas, arena, grava, diatomita, caolín, bentonita, sílice, barita, yeso, montmorillonita y talco o una mezcla de dos o más de ellos. Preferiblemente, el mineral industrial se selecciona entre caolín, talco y bentonita o una mezcla de dos o más de los mismos. Más preferiblemente, el mineral industrial se selecciona entre el caolín y el talco o una mezcla de los mismos.

Las esporas o conidios de hongos entomopatógenos de uso en la invención se pueden seleccionar de especies tales como *Beauveria bassiana* spp., *Paecilomyces fumosoroseus* spp., y *Lecanicillium* spp. Preferiblemente, el hongo entomopatógeno se selecciona de especies de *Beauveria bassiana* que son capaces de germinar y penetrar en las cutículas de artrópodos de infestación de zonas de almacenamiento de productos secos en una zona de almacenamiento de productos secos como se define en este documento. Las cepas de hongos entomopatógenos preferidas para adquirir esporas o conidios de uso en formulaciones y composiciones de la invención incluyen las seleccionadas de la especie *Beauveria bassiana*. Una cepa apropiada de *Beauveria bassiana* para uso en el suministro de esporas o conidios de utilidad en la invención es la cepa depositada bajo the Budapest Treaty, IMI 398548, depositado en the Centre for Agriculture and Biosciences International (CABI), Bakeham Lane, Egham, Surrey, TW20 9TY, UK el 11 de mayo de 2010.

Las formulaciones de la invención también se usan para proporcionar una cubierta o capa a superficies de almacenamiento de productos secos de al menos  $1 \times 10^9$  conidios/m<sup>2</sup>, preferiblemente desde  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{11}$  conidios/m<sup>2</sup>. Para los propósitos de la presente invención y en consonancia con lo que se ha indicado anteriormente, las "esporas" 'CFU' y 'conidios' se usan indistintamente a menos que el contexto lo exija de otra manera. De este modo, los valores numéricos de CFU/m<sup>2</sup>, esporas/m<sup>2</sup> y conidios/m<sup>2</sup> significan lo mismo, por ejemplo,  $1 \times 10^9$  esporas/m<sup>2</sup> significa lo mismo que  $1 \times 10^9$  CFU/m<sup>2</sup> y  $1 \times 10^9$  conidios/m<sup>2</sup>.

Las formulaciones de la invención pueden contener también excipientes apropiados comúnmente empleados en la técnica, tales como agentes de flujo o agentes antiaglutinantes seleccionados entre bicarbonato de sodio, ferrocianuro de sodio, ferrocianuro de potasio, ferrocianuro de calcio, fosfato óseo, silicato de sodio, dióxido de silicio, silicato de calcio, trisilicato de magnesio, aluminosilicato de sodio, silicato de potasio y aluminio, aluminosilicato de calcio, ácido esteárico, polidimetilsiloxano y similares.

Además, las formulaciones de la invención pueden contener otros componentes tales como aditivos seleccionados de bloqueadores de UV tales como betacaroteno o ácido p-aminobenzoico, agentes colorantes tales como abrillantadores ópticos y agentes colorantes disponibles comercialmente, tales como agentes colorantes alimenticios, plastificantes tales como glicerina o aceite de soja, antimicrobianos tales como sorbato de potasio, nitratos, nitritos, óxido de propileno y similares, antioxidantes tales como vitamina E, hidroxil anisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), y otros antioxidantes que pueden estar presentes, o mezclas de los mismos. El experto en el arte apreciará que la selección de tales aditivos comúnmente incluidos se hará dependiendo del propósito final, y de la necesidad percibida.

Naturalmente, el destinatario experto también apreciará que las formulaciones de la invención también se pueden aplicar a masas de productos secos y mezclarse en ellas, confiriendo de este modo protección contra la infestación de artrópodos a los productos secos *per se*, durante el almacenamiento. El experto en el arte apreciará también que las formulaciones secas de la invención que contienen los tres componentes definidos anteriormente se pueden aplicar a las masas de siembra destinadas a la siembra o a las masas de semillas destinadas al consumo ya que los componentes individuales de la formulación de polvo seco no se consideran tóxicos a ganado doméstico y/u hombre al nivel de adición definido en este documento.

Las formulaciones de acuerdo con la invención son activas contra artrópodos de almacenamiento de productos secos, tales como *Trigoderma* spp. (escarabajo de Khapra), *Lasioderma serricorne* (escarabajo de cigarrillo), *Ahasversus advena* (escarabajo de grano foráneo), *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais*,

*Rhyzopertha dominica*, *Ahasverus advena*, *Oryzaephilus spp*, tales como *Oryzaephilus surinamensis*, *Prostephanus truncates*, *Rhyzopertha dominica* (barrenador menor de los granos), *Cryptolestes spp.* tales como *Cryptolestes ferrugineus*, *Tribolium spp.*, *Plodia interpunctella* (polilla de la fruta seca), *Ephestia cautella* (polilla de almendra), Ácaros incluyendo *Acarus siro* (ácaro de la harina), *Aceria tulipae* (ácaro de agallas) y *Psocoptera* (piojos de libros).

5 Por lo general, las formulaciones de la invención muestran actividad contra artrópodos tales como *Oryzaephilus surinamensis*, *Sitophilus granaries* (gorgojo de granos) y *Cryptolestes ferrugineus*.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona el uso de una formulación de la invención para controlar la infestación de artrópodos en una zona de almacenamiento de productos secos (instalación). Las zonas de almacenamiento de productos secos en las que el uso de una formulación de la invención es apropiado incluyen zonas de almacenamiento de productos secos, tales como silos de grano y bandejas de grano donde el grano se almacena inmediatamente después de la cosecha o antes del procesamiento. Otras zonas de almacenamiento de productos secos incluyen almacenes, instalaciones de almacenamiento en supermercados, contenedores de barcos, contenedores de carga tales como cajas, cajones de embalaje y contenedores asociados con y/o en trenes, barcos, aviones y vehículos de transporte por carretera. Para los propósitos de la presente invención, los términos "producto seco" y "productos secos" se usan indistintamente y abarcan productos secos que incluyen granos enteros para siembra o granos enteros para uso como alimento y/o en la fabricación de alimentos procesados, y sitios de almacenamiento para la madera y productos hechos de madera. Los granos enteros incluyen aquellos tales como el trigo, el arroz, la cebada y el maíz (a menudo denominados maíz), legumbres, frijoles, lentejas y productos derivados o elaborados con productos secos. Tales productos de productos secos incluyen también alimentos procesados tales como pastas, harinas de grano, cuscús, cereales, hierbas secas, cereales para el desayuno, sémolas, panes, nueces (nueces molidas, en hojuelas y/o enteras), comida para merienda, tal como productos dulces y salados incluyendo galletas, patatas fritas, crujientes vegetales, pretzels, galletas de queso, obleas secas y similares. La madera incluye madera, tabloncillos, artículos de madera tales como andamios para edificios, revestimientos, puertas y marcos de puertas, dinteles, zócalos, tableros duros, madera contrachapada, muebles y similares, y piensos de ganado doméstico para cerdos, vacas, ovejas y caballos y similares.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método de producción de una formulación de polvo seco de la invención que comprende las etapas de:

i) micronizar partículas de electroto secas;

ii) mezclar esporas secas de *Beauveria bassiana* tales como esporas secas de la cepa IMI 398548, con las dichas partículas de electroto; y

iii) mezclar partículas de tierra minerales industriales secas con el producto de la etapa ii).

Las partículas de electroto de uso en la presente invención, tales como partículas de cera de carnauba, se fabrican triturando cera de carnauba sin refinar (disponible en The British Wax Refining Co. Ltd., 62 Holmethorpe Avenue, Holmethorpe Industrial Estate, Redhill, Surrey, UK), se muelen, seguido por una etapa de micronización usando técnicas comúnmente empleadas en la técnica. Para obtener partículas de electroto de un diámetro medio de volumen de uso en la invención, los bloques sólidos de material de los que se pueden fabricar partículas de electroto en forma, por ejemplo, de bloques o tabletas de 1 a 5 kilogramos, se pueden descomponer o cortar en pequeñas piezas de tamaño milimétrico (tales como de 2-8 mm de diámetro aproximado en tamaño, por ejemplo, de 4 a 6 mm) en una máquina de troceado. Las piezas de tamaño milimétrico se hacen pasar entonces a través de un medio de trituración tal como un molino estándar, por ejemplo, un molino de trituración Apex, y se muelen o trituran en partículas que tienen un diámetro aproximado en el intervalo desde 100  $\mu\text{m}$  a 500  $\mu\text{m}$ , por ejemplo, de 250  $\mu\text{m}$  a 300  $\mu\text{m}$ . Las partículas trituradas de tamaño micrométrico se pasan a continuación a través de un aparato de micronización, tal como un molino de aire de micronización AFG para obtener partículas de un intervalo de tamaño de VMD deseado tal según lo descrito en este documento, tal como de 10  $\mu\text{m}$  a 40  $\mu\text{m}$ , que es de uso en la presente invención. El destinatario experto apreciará que tales procedimientos para obtener partículas pequeñas son bien conocidos en la técnica.

La micronización de partículas secas de electroto se puede conseguir moliendo a  $\leq 4000$  rpm. Si se puede retener la eficacia usando concentraciones más altas de cera de carnauba (por ejemplo, 75% de cera en comparación con 25%) entonces esto reducirá el riesgo de inhalación que plantea la formulación. También es probable que el aumento de la concentración de cera de carnauba sea beneficioso para la aplicación del producto aumentando el volumen del producto a la misma concentración de esporas, haciendo de este modo que sea más fácil aplicar uniformemente sobre la misma superficie.

Las partículas de mineral industrial son preferiblemente de un diámetro medio de volumen de  $\geq 5$   $\mu\text{m}$  o más de tamaño, tal como 10  $\mu\text{m}$ -60  $\mu\text{m}$ , preferiblemente 10  $\mu\text{m}$ -40  $\mu\text{m}$ , por ejemplo 10  $\mu\text{m}$ . Sin la intención de estar limitado por la teoría, se cree que el tamaño de las partículas minerales de tierra juega un papel en la inhibición de la respiración en los artrópodos que entran en contacto con ellos. El mineral industrial se puede seleccionar entre

5 cualquier mineral industrial capaz de ser utilizado en la presente invención, tales como arcillas, tierra de diatomeas, arena, grava, diatomita, caolín, bentonita, sílice, barita, yeso, montmorillonita y talco o una mezcla de dos o más de los mismos. Preferiblemente, el mineral industrial se selecciona entre caolín, talco y bentonita o una mezcla de dos o más de los mismos. Más preferiblemente, el mineral industrial se selecciona entre el caolín y el talco o una mezcla de los mismos.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una formulación en polvo seco de la invención producida por el proceso de:

i) micronizar partículas de electreto secas;

10 ii) mezclar esporas secas de *Beauveria bassiana* tales como esporas secas de la cepa IMI 398548, con las dichas partículas de electreto; y

iii) mezclar partículas de tierra minerales industriales secas con el producto de la etapa ii).

15 En cuanto al método de producción de una formulación de polvo seco de la invención que contiene partículas de electreto de un diámetro medio de volumen de uso en la invención, bloques sólidos de material de los que se pueden fabricar partículas de electreto en forma, por ejemplo, de bloques o tabletas de 1 a 5 kilogramos se pueden descomponer o cortar en pequeñas piezas de tamaño milímetro (por ejemplo, de 2-8 mm de diámetro aproximado en tamaño, por ejemplo, de 4 a 6 mm) en una máquina de troceado. Las piezas de tamaño milimétrico se hacen pasar entonces a través de un medio de trituración tal como un molino estándar, por ejemplo, un molino de trituración de Apex, y se muelen o trituran en partículas que tienen un diámetro aproximado en el intervalo de 100  $\mu\text{m}$  a 500  $\mu\text{m}$ , por ejemplo, desde 250  $\mu\text{m}$  a 300  $\mu\text{m}$ . Las piezas de tamaño micrométrico se pasan a continuación a través de un aparato de micronización, tal como un molino de chorro clasificador de aire, por ejemplo, un molino de 20 aire de micronización AFG para obtener partículas de un intervalo de tamaño de VMD deseado según lo descrito en este documento, tal como desde 10  $\mu\text{m}$  a 40  $\mu\text{m}$ , es decir de uso en la presente invención. El destinatario experto apreciará que tales procedimientos para obtener partículas pequeñas son bien conocidos en la técnica.

25 La micronización de partículas secas de electreto se puede conseguir moliendo a  $\leq 4000$  rpm. Las esporas tienen una influencia mucho más fuerte en el VMD que la cera de carnauba porque son menos densas y por lo tanto para el mismo peso ocupan aproximadamente tres veces más volumen (estimación visual) que la cera de carnauba. Si se puede retener la eficacia usando concentraciones más altas de cera de carnauba (por ejemplo, 75% de cera en comparación con 25%) entonces esto reducirá el riesgo de inhalación que plantea la formulación. También es probable que el aumento de la concentración de cera de carnauba sea beneficioso para la aplicación del producto aumentando el volumen del producto a la misma concentración de esporas, haciendo de este modo que sea más 30 fácil aplicar uniformemente sobre la misma superficie.

Las partículas de mineral industrial son preferiblemente de  $\geq 5$   $\mu\text{m}$  o más de tamaño, preferiblemente  $\geq 10$   $\mu\text{m}$  por ejemplo 10  $\mu\text{m}$ . Se cree que el tamaño de las partículas minerales de tierra juega un papel en la inhibición de la respiración en los artrópodos que entran en contacto con ellas. El mineral industrial se puede seleccionar entre 35 cualquier mineral industrial capaz de ser utilizado en la presente invención, tales como arcillas, tierra de diatomeas, arena, grava, diatomita, caolín, bentonita, sílice, barita, yeso, montmorillonita y talco o una mezcla de dos o más de ellos. Preferiblemente, el mineral industrial se selecciona entre caolín, talco y bentonita o una mezcla de dos o más de los mismos. Más preferiblemente, el mineral industrial se selecciona entre caolín y talco o una mezcla de los mismos.

40 En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método de control de la infestación de artrópodos de productos secos en una zona de almacenamiento de productos secos, en el que una formulación de polvo seco de la invención se presenta a las superficies de una zona de almacenamiento de productos secos por

i) recoger la formulación de polvo seco en un aparato de pulverización; y

45 ii) liberar la dicha formulación de polvo seco desde el dicho aparato de pulverización y hacia la dicha zona de almacenamiento de productos secos.

Para los propósitos de la presente invención, "controlar la infestación por artrópodos de productos secos" significa que la población de artrópodos a la que se aplican las formulaciones de la invención es aquellas que sufren pérdidas debido a muerte, mala salud que puede conducir finalmente a la muerte, y/o incapacidad para reproducir o reducir la capacidad de reproducirse. Preferiblemente, el control de poblaciones de artrópodos de almacenamiento significa 50 que al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, de la población de artrópodos muere dentro de los 28 días de aplicación de las composiciones de la invención. Preferiblemente, las poblaciones de artrópodos que se ven afectadas negativamente por las composiciones de la invención mueren o al menos sufren efectos subletales que contribuyen a la reducción de la población a largo plazo como resultado de la aplicación de formulaciones de polvo seco de la invención a la zona de almacenamiento del producto seco. El experto en el arte apreciará que la

población de artrópodos de almacenamiento de productos secos a los que se aplican las formulaciones de la invención puede estar constituida por una o más especies de artrópodos. De este modo, el método de control de la infestación de artrópodos en productos secos en una zona de almacenamiento de productos secos incluye presentar una formulación de polvo seco de la invención a las superficies de una zona de almacenamiento de productos secos.

5 A continuación, siguen los ejemplos e ilustran la invención. Se debe entender que la enseñanza de los ejemplos no debe interpretarse como limitativa de la invención de ninguna manera.

## Sección experimental

### Experimento 1

10 Uso de *Beauveria bassiana* (Bals.) para el control del barrenador mayor de granos (*Prostephanus truncatus* Horn.) de maíz almacenado: Respuesta de *Prostephanus truncatus* a cuatro concentraciones (CFU/kg de maíz) de *B. bassiana*, IMI 398548 en el laboratorio

#### 1. Resumen

15 Un estudio anterior sobre la patogenicidad de *Beauveria bassiana*, IMI 398548 a *Prostephanus truncatus*, *Sitophilus zeamais* y *Terebrivorus nigrescens* identificó *B. bassiana*, IMI 398548 que era patogénico contra adultos de *P. truncatus*, *S. zeamais* y *T. nigrescens*. Para determinar la concentración más eficaz de *B. bassiana* para el control de *P. truncatus* para los ensayos semicampo, se realizó un estudio de laboratorio de la respuesta de *P. truncatus* adulto a cuatro concentraciones de *B. bassiana*, IMI 398548 ( $10^8$  a  $10^{11}$  CFU/Kg de maíz).

20 Se utilizó un diseño completamente al azar (CRD) con 5 tratamientos (*P. truncatus* infestado con cuatro concentraciones ( $10^8$  a  $10^{11}$  CFU/kg de maíz) de polvo de esporas de *B. bassiana*, IMI 398548 y un control negativo donde no se adicionó *B. bassiana* con cinco repeticiones.

25 Los granos de maíz (1250 g cada uno) se mezclaron a fondo con las diversas concentraciones ( $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  y  $10^{11}$ CFU) de *B. bassiana* IMI 398548. Cada uno de los cuatro tratamientos se dividió entonces en cinco partes iguales para representar 5 repeticiones (250 g) cada uno y se colocaron en frascos de 500 mL Kilner en un diseño completamente al azar (CRD). A continuación, se introdujeron *P. truncatus* (50) adultos en los tratamientos después de 24 horas. Con el fin de determinar la viabilidad del hongo se trataron otros 1250 g de maíz con  $10^{11}$  unidades formadoras de colonias (CFU) de *B. bassiana* y se contaron las CFU al comienzo y al final del ensayo. Hubo un tratamiento de control negativo en el que no se adicionó *B. bassiana*. Todos los tratamientos se mantuvieron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $65 \pm 5\%$  de rh.

30 La mortalidad de *P. truncatus* se evaluó a intervalos de 7 días durante 3 semanas. Para determinar si la muerte fue como resultado de la micosis causada por *B. bassiana*, IMI 398548, se incubaron cadáveres de insectos en placas de Petri para verificar la colonización por el hongo.

35 La colonización de cadáveres se observó durante un periodo de 4 a 6 días a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $65 \pm 5\%$  de rh. Los resultados revelaron que *B. bassiana*, IMI 398548 a  $10^{10}$  y  $10^{11}$  CFU por kg de maíz resultó en una mortalidad significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) de *P. truncatus* adulto en comparación con  $10^8$  y  $10^9$  CFU por kg de maíz.

40 Para estas concentraciones ( $10^{10}$  y  $10^{11}$  CFU por kg de maíz), la mortalidad de *P. truncatus* adultos fue de 64.7-68.0% después de 7 días de exposición que alcanzó 96.0% y 98.7% respectivamente 14 días después del tratamiento. Por el contrario, la mortalidad de *P. truncatus* adultos en  $10^8$  y  $10^9$  CFU por kg de maíz de *B. bassiana*, IMI 398548 fue  $<13\%$  7 días después de la exposición y permaneció menos del 30%, 21 días después de la exposición. La mortalidad de *P. truncatus* en el tratamiento de control (donde no se adicionó *B. bassiana*) fue  $<10\%$  al final de los 21 días.

El micelio de autopsia y el crecimiento de conidios mostraron que la mayoría de *P. truncatus* murió de infección por el hongo con un porcentaje de micosis para las cuatro concentraciones ( $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  y  $10^{11}$  CFU por kg de maíz) de *B. bassiana*, de 97.1, 98.6, 99.6 y 99.6, respectivamente.

#### 45 2. Objetivo

Evaluar la respuesta de *Prostephanus truncatus* a cuatro concentraciones (CFU/kg de maíz) de *B. bassiana*, IMI 398548 en el laboratorio.

#### 3. Introducción y esquema de estudio

Determinar la concentración más eficaz de *B. bassiana* para el control de *P. truncatus* para los ensayos semicampo, se realizó un estudio de laboratorio de la respuesta de *P. truncatus* adulto a cuatro concentraciones ( $10^8$  a  $10^{11}$  CFU por kg de maíz) de *B. bassiana*, IMI 398548.

#### Descripción del experimento

- 5 Los adultos de *P. truncatus* se criaron en el laboratorio en Plant Protection and Regulatory Service of Ghana (PPRSD) bajo condiciones ambientales ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $65 \pm 5\%$  de rh). Un mes después de la eclosión de adultos, los insectos se cultivaron en granos enteros de maíz. Los granos de maíz (1250 g cada uno) se mezclaron a fondo con las diversas concentraciones ( $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  y  $10^{11}$  CFU) de *B. bassiana*, IMI 398548. Cada uno de los cuatro tratamientos se dividió a continuación en cinco partes iguales para representar 5 repeticiones (250 g) cada uno y se colocaron en frascos de 500 mL Kilner. A continuación, se introdujeron *P. truncatus* (50) adultos en los tratamientos después de 24 horas. Con el fin de determinar la viabilidad del hongo, se trataron otros 1250 g de maíz con *B. bassiana* a  $10^{11}$  CFU y se determinaron unidades formadoras de colonias (CFU) al comienzo y al final del ensayo. Hubo un tratamiento de control negativo en el que no se adicionó *B. bassiana*. Todos los tratamientos se mantuvieron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $65 \pm 5\%$  de rh. La mortalidad de *P. truncatus* se evaluó a intervalos de 7 días durante 3 semanas (días 7, 14 y 21). Se realizó la autopsia en cadáveres de los insectos para determinar si la muerte se debía a la micosis causada por *B. bassiana*, IMI 398548.

#### Métodos

##### 4. Detalles de los productos del ensayo

Los materiales proporcionados por Exosect para el ensayo de respuesta a la dosis fueron:

- 20 Cuatro bolsitas, conteniendo cada una 3 g de formulación A ( $10^8$  CFU por kg de maíz).  
 Cuatro bolsitas, conteniendo cada una 3 g de formulación B ( $10^9$  CFU por kg de maíz).  
 Cuatro bolsitas, conteniendo cada una 3.2 g de formulación C ( $10^{10}$  CFU por kg de maíz).  
 Cuatro bolsitas, conteniendo cada una 4.5 g de formulación D ( $10^{11}$  CFU por kg de maíz).  
 A: 2 g de caolín + 0.3 g de entostat + 0.001 g de esporas/Kg de maíz  
 25 B: 2 g de caolín + 0.3 g de entostat + 0.01 g de esporas/Kg de maíz  
 C: 2 g de caolín + 0.3 g de entostat + 0.1 g de esporas/Kg de maíz  
 D: 2 g de caolín + 0.3 g de entostat + 1.0 g de esporas/Kg de maíz

##### Fuente de Insectos

- 30 El mes después de la eclosión de adultos de *P. truncatus* usados para el ensayo, se criaron en granos enteros de maíz a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $65 \pm 2\%$  de rh en the Entomology laboratory of the Biocontrol Unit, Plant Protection and Regulatory Service of MOFA, Accra.

Determinación de las concentraciones de *Beauveria bassiana*, IMI 398548 para la protección del maíz almacenado contra *Prostephanus truncatus*

- 35 Para determinar la concentración más eficaz de la formulación de *B. bassiana*, IMI 398548 para la protección del maíz almacenado contra *P. truncatus*, se llevó a cabo un estudio de laboratorio con cuatro concentraciones ( $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  y  $10^{11}$  CFU por kg de maíz) de *B. bassiana*, IMI 398548.

- 40 El maíz (cultivar 'Obatanpa') se almacenó en un congelador, a  $-4^\circ\text{C}$  durante 2 días. El maíz se retiró entonces, se secó en horno durante un día a  $50^\circ\text{C}$  y se dejó enfriar durante un día más. El maíz (2500 g) se trató con 4.5 g de *B. bassiana* ( $1 \times 10^{11}$  CFU/kg de maíz) y se dividió en 10 jarras que contenían alícuotas de 250 g cada una. Cinco de estas jarras se utilizaron para la evaluación de la mortalidad, mientras que los otros cinco se utilizaron para las pruebas de viabilidad inicial y final. Para las otras concentraciones se mezclaron a fondo 1,250 g de maíz con 3.2 g de *B. bassiana* a  $10^{10}$  CFU/kg de maíz, 3 g de *B. bassiana* a  $10^8$  y  $10^9$  CFU y se dividieron en cinco partes iguales (250 g) representando cinco repeticiones. Hubo un control negativo en el que no se adicionó *B. bassiana*. Los granos se dejaron durante 24 horas después de lo cual se introdujeron 50 *P. truncatus* sin sexar en cada jarra. Los tratamientos se dejaron en condiciones de laboratorio de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $65 \pm 5\%$  de rh. La temperatura y la humedad relativa en the Entomology laboratory of the Department of Crop Science, Legon, donde se realizó este bioensayo, se controlaron usando un registrador de datos.



Después de introducir los insectos, se muestrearon 5 g de granos de maíz de cada repetición de *B. bassiana* a  $1 \times 10^{11}$  CFU/kg de maíz (que no tenía insectos) y se lavaron en 10 mL de Tween 80 al 0.05% estéril. La suspensión se agitó ligeramente agitando suavemente durante unos pocos minutos antes de realizar una dilución en serie de 10 veces dando como resultado 8 diluciones. Se inocularon alícuotas de 200  $\mu$ l de cada dilución por duplicado en agar de dextrosa Sabouraud (SDA) usando la técnica de placa extendida y se incubaron durante 4 días para determinar el número de unidades formadoras de colonias (CFU) por mL

Se registró la mortalidad de *P. truncatus* a intervalos de 7 días durante tres semanas, evacuando cada jarra en bandejas de laboratorio. Los insectos muertos se eliminaron a cada tiempo de evaluación y la superficie se esterilizó en hipoclorito de sodio al 2% durante 1 minuto, seguido de dos enjuagues en agua destilada estéril durante 1 minuto. Los cadáveres de cada tratamiento se transfirieron a continuación sobre papel de filtro Whatman humedecido con 1 mL de agua destilada estéril, se colocaron en placas de Petri de 9 cm y se sellaron con Parafilm. Los insectos en papeles de filtro humedecidos se mantuvieron separados y se incubaron en condiciones ambientales y se examinaron después de 6 días para el crecimiento de *B. bassiana*, IMI 398548.

El día 21, se determinó la viabilidad fúngica como se hizo el primer día del experimento determinando el recuento de CFU por mL. Los granos fueron tamizados para separar el polvo de grano del grano. Se registró el peso del polvo, el grano y el número de *P. truncatus* vivos en cada jarra. El porcentaje de pérdida de peso (L) se calculó utilizando la siguiente fórmula,

$$L = [(W_i - W_f) / W_i] \times 100,$$

donde  $W_i$  es el peso inicial de los granos y  $W_f$  es el peso final de los granos.

Los datos del porcentaje acumulado de mortalidad y el porcentaje de micosis fueron sometidos a una transformación arco seno; los datos adicionales recogidos fueron el número total de *P. truncatus* vivos en el día 21, peso de grano y polvo al final del experimento, número de colonias formadas por la concentración más alta al inicio y al final del ensayo.

Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó una diferencia mínima significativa ( $LSD_{5\%}$ ) para separar la media. El análisis estadístico se realizó utilizando software estadístico Genstat (9ª) edición.

#### 5. Sistema de prueba

Todos los insectos que totalizan 1000 de *P. truncatus* adultos sin sexar fueron suministrados por Plant Protection and Regulatory Service Ghana (PPRSD). Los insectos se criaron en granos enteros de maíz en the Biocontrol Unit of PPRSD en condiciones ambientales ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $65 \pm 5\%$  de rh). Los insectos utilizados fueron aproximadamente un mes después de la eclosión del adulto.

#### 6. Localización del ensayo

El bioensayo de respuesta a la dosis se llevó a cabo en the Entomology laboratory of the Department of Crop Science, Legon a una temperatura ambiente promedio de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $65 \pm 5\%$  de rh. Los cadáveres de insectos se incubaron a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $65 \pm 5\%$  de rh respectivamente en the Pathology laboratory of the Department of Crop Science, University of Ghana.

#### 7. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar (CRD) con 5 tratamientos (*P. truncatus* infestado con cuatro concentraciones ( $10^8$  a  $10^{11}$  CFU/kg de maíz) de polvo de esporas de *B. bassiana*, IMI 398548 y un control negativo que no tenía *B. bassiana* con cinco repeticiones. Cada repetición contenía 50 *P. truncatus* adultos.

#### 8. Detalles y régimen de la solicitud

El peso de grano de maíz y polvo al final del experimento se pesaron usando una balanza electrónica.

#### 9. Análisis estadístico

La mortalidad control al final del ensayo (21 días) fue relativamente baja (<10%), por consiguiente, no se corrigieron los datos de porcentaje acumulado de mortalidad para la mortalidad control correspondiente (Abbott, 1925).

Los datos de porcentaje acumulado de mortalidad y porcentaje de micosis fueron sometidos a una transformación arco seno; los datos adicionales recogidos fueron el número total de *P. truncatus* vivos al día 21, peso de grano y polvo al final del experimento, número de colonias formadas a partir de *B. bassiana* a  $10^{11}$  CFU/kg de maíz (que no tenía insectos) al inicio y final del ensayo (Apéndice 3-10).

Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó una diferencia mínima significativa (LSD<sub>5%</sub>) para separar las medias. El análisis estadístico se realizó utilizando el software estadístico Genstat (9ª edición).

10. Desviaciones del protocolo

5 El protocolo propuesto fue estrictamente respetado excepto que no se mencionó el "control" que se consideró apropiado y por lo tanto incluido en este ensayo.

11. Resultados

Respuesta de *Prostephanus truncatus* a cuatro concentraciones (CFU/kg de maíz) de *B. bassiana*, IMI 398548 en el laboratorio.

10 La respuesta de *P. truncatus* a *B. bassiana*, IMI 398548 se evaluó aplicando cuatro concentraciones de *B. bassiana* (10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup> y 10<sup>11</sup> CFU) por kg de maíz durante 21 días para determinar su efecto sobre la mortalidad de *P. truncatus*. La cuantificación de la mortalidad de un mes después de la eclosión de *P. truncatus* adultos se realizó a los 7, 14 y 21 días después de la infestación. Para todas las concentraciones, la mortalidad de *P. truncatus* aumentó con el aumento de los días de exposición. *Beauveria bassiana*, IMI 398548 a 10<sup>10</sup> y 10<sup>11</sup>CFU por kg de maíz resultó en una mortalidad significativamente mayor (P <0.05) de *P. truncatus* adultos en comparación con 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> CFU por kg de maíz. Para estas concentraciones (10<sup>10</sup> y 10<sup>11</sup>), la mortalidad de *P. truncates* fue de 64.7-68.0% después de 7 días de exposición, alcanzando 96.0% y 98.7% respectivamente después de 14 días. En contraste, la mortalidad de *P. truncatus* adultos en *B. bassiana*, IMI 398548 a 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> CFU por kg de maíz fue <13% después de 7 días de exposición y permaneció menos del 30%, 21 días después de la exposición. La mortalidad de *P. truncatus* en el tratamiento de control (donde no se adicionó *B. bassiana*) fue <10% al final de 21 días (Tabla 1).

Tabla 1. Mortalidad porcentual acumulada (%) de *P. truncatus* infestado con polvo de spora de *B. bassiana* (CFU por kg de maíz) e incubado durante 7, 14 y 21 días a 25 ± 2°C y 65 ± 5% de rh en el laboratorio.

Dosis de <i>B. bassiana</i> (CFU/por kg de maíz)	Mortalidad acumulada (%) en los días después del tratamiento		
	7	14	21
1X10 <sup>8</sup>	5.33	10.00	14.67
1X10 <sup>9</sup>	12.67	22.00	28.00
1X10 <sup>10</sup>	64.67	96.00	100.00
1X10 <sup>11</sup>	68.00	98.67	100.00
Control	1.33	4.67	9.33
LSD (p<0.05)	6.97	4.20	3.87

20 Media de la pérdida de peso en porcentaje de grano después de la infestación por *P. truncatus* tratado con *B. bassiana* (10<sup>8</sup> a 10<sup>11</sup> CFU) por kg de maíz y se incubó a 25 ± 2°C y 65 ± 5% de rh, durante 21 días.

25 El porcentaje de pérdida de peso del grano de maíz causada por *P. truncatus* tratado con *B. bassiana* a 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> CFU por kg de maíz no fue significativamente diferente del tratamiento de control. La pérdida de peso (%) de grano producida por *P. truncatus* en *B. bassiana* a 10<sup>10</sup> y 10<sup>11</sup>CFU por kg de maíz fue similar, pero difería significativamente (P <0.05) del control. Se registró una pérdida de peso del grano significativamente mayor (P <0.05) en granos de maíz tratados con *B. bassiana*, IMI 398548 a 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> CFU por kg de maíz en comparación con 10<sup>10</sup> y 10<sup>11</sup> CFU por kg de maíz después de la infestación por *P. truncates* durante 21 días (Tabla 2).

Tabla 2. Media de la pérdida de peso (%) del grano después de la infestación por *P. truncatus* infestado con *B. bassiana* (10<sup>8</sup> a 10<sup>11</sup> CFU) por kg de maíz e incubado durante 21 días a 25 ± 2°C y 65 ± 5% de rh en el laboratorio.

Dosis (CFU/ kg de maíz)	% de pérdida de peso del grano	
1X10 <sup>8</sup>	1.554	
1X10 <sup>9</sup>	1.460	
1X10 <sup>10</sup>	0.439	Viabilidad y persistencia de <i>B. bassiana</i> ,
1X10 <sup>11</sup>	0.400	IMI 398548 a 10 <sup>11</sup> CFU por kg de maíz
Control	1.528	
LSD (p< 0.05)	0.2927	

5 El número de colonias formadas por la concentración más alta (10<sup>11</sup> CFU por kg de maíz) al día 1 no era significativamente diferente de los del día 21 ( $t = 0.10$ ,  $t$ -prob. = 0.922,  $df = 4$ ). El micelio de la autopsia y el crecimiento de conidios mostraron que la mayoría de los insectos habían muerto de infección por el hongo con un porcentaje de micosis en las cuatro concentraciones (10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup> y 10<sup>11</sup> CFU por kg de maíz) de *B. bassiana*, de 97.1, 98.6, 99.6 y 99.6 respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Media (%) micosis de *P. truncatus*, infestado con *B. bassiana* (10<sup>8</sup> a 10<sup>11</sup> CFU) por kg de maíz e incubado durante 4 días a 26 ± 2°C y 65 ± 5% de rh en el laboratorio.

Dosis (CFU/ kg de maíz)	Porcentaje de micosis
1X10 <sup>8</sup>	97.1
1X10 <sup>9</sup>	98.6
1X10 <sup>10</sup>	99.6
1X10 <sup>11</sup>	99.6
LSD (p< 0.05)	4.9

10 El análisis de varianza se realizó sobre los datos del porcentaje de esporulación arcoseno

## 12. Discusión

15 Este es el primer informe de un nuevo aislado (IMI 398548) de *B. bassiana* para el control de *P. truncatus*. *B. bassiana*, IMI 398548 a 10<sup>10</sup> y 10<sup>11</sup> CFU por kg de maíz dio como resultado una mayor mortalidad de *P. truncatus* adultos en comparación con 10<sup>8</sup> CFU y 10<sup>9</sup> por kg de maíz. En el presente estudio, la mayor mortalidad (64.7-68.0%) de *P. truncatus* se alcanzó en *B. bassiana* a 10<sup>10</sup> y 10<sup>11</sup> CFU por kg de maíz, respectivamente, a 25 ± 2°C y 65 ± 5% de rh después de 7 días de exposición alcanzando 96.0% y 98.7% respectivamente 14 días después del tratamiento.

20 En el presente estudio, la viabilidad de los conidios de *B. bassiana* a 10<sup>11</sup> CFU por kg de maíz persistió a lo largo del período de estudio durante 21 días. Esto demuestra el requisito de que la formulación micopesticida debe persistir en el ambiente durante un tiempo considerable después de la aplicación (Borges, 1998). Un resultado similar se prevé bajo condiciones de semicampo, ya que las condiciones de almacenamiento de granos en Ghana son más estables y similares a las condiciones observadas en el estudio.

25 Una de las enormes ventajas de usar sistemas de control microbianos es que el ciclo de infección de la enfermedad ocurre cuando los insectos infectados y muertos aumentan la cantidad de inóculos después de la esporulación para aumentar efectivamente la persistencia del micopesticida (Hidalgo et al., 1998). Durante este estudio, los cadáveres de insectos se eliminaron consistentemente de los granos de maíz, sin embargo, el micelio de *B. bassiana* y la esporulación de esporas aparecieron 3-4 días después de la incubación y cubrieron completamente los cadáveres de *P. truncatus*, indicando la existencia de una transferencia de dosis adecuada de granos de maíz tratados. El presente estudio indicó la posibilidad de controlar con éxito *P. truncatus* en maíz almacenado e infestado usando polvo de esporas de *B. bassiana* a 1 x 10<sup>10</sup> CFU por kg de maíz en el laboratorio.

30 13. Referencias

Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18: 265-267.

Burges H. D. (1998). Formulation of mycoinsecticides, In H. D. Burges, (ed.), *Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*: Kluwer Academic Publisher, Dordrecht pp 132-185.

- 5 Hidalgo, E., D. Moore & G. Le Patourel. (1998). The effect of different formulations of *Beauveria bassiana* on *Sitophilus zeamais* in stored maize. *Journal of Stored Product Research* 34: 171-179.

## Experimento 2

Ensayo a escala piloto de formulaciones de biopesticidas en el almacén de granos

### 1. Objetivo

- 10 Evaluar los conidios secos de un aislado del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en diferentes concentraciones contra tres especies de insectos cuando se aplican a arenas de acero galvanizado y se almacenan en el ambiente de almacén de grano.

### 2. Introducción

- 15 El objetivo de este estudio fue realizar una prueba de determinación de intervalo para determinar la dosis eficaz de polvo de conidios secos de *B. bassiana* IMI398548 (un cultivo biológicamente puro de un nuevo aislado de *Beauveria bassiana* depositado con CABI, Bakeham Lane, Egham, Surrey, TW20 9TY, UK on 11th May 2010 de conformidad con el tratado de Budapest para el depósito de microorganismos y concedió el número de depósito de IMI 398548) contra tres especies de escarabajo cuando se aplica a las arenas de acero en el almacén de grano Fera. El entostat no se incluyó en este estudio como el objetivo era evaluar el efecto de los conidios en la ausencia  
20 de cualquier material que puede mejorar el efecto

### 3. Materiales

#### 3.1 Aislado fúngico

- 25 El aislado de *B. bassiana* (IMI398548) fue producido por Somycel S.A. usando un método de producción en masa y se verificó utilizando procedimientos internos de control de calidad (QC). El producto final contenía  $9.3 \times 10^{10}$  conidios/g. El aislado se designó como TA 2645 para los propósitos de este estudio y se almacenó en un refrigerador a 4-8°C.

#### 3.2 K-Obiol

- 30 Se obtuvo K-Obiol EC25 (TA 2644) (que contenía 25 g/l de ingrediente activo) de Killgerm Chemicals y se usó como control positivo. Antes del tratamiento, el pesticida se almacenó en un armario seguro situado en un laboratorio con una temperatura media de  $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  y humedad relativa ambiente (r.h.). Una solución que contenía las tasas de aplicación de campo recomendada se preparó en agua, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, el día de uso.

#### 3.3 Insectos

- 35 Se ensayaron tres especies de insectos. Estos fueron la cepa Tram de *Oryzaephilus surinamensis* (escarabajo de grano de dientes de sierra), la cepa de Gainsborough de *Sitophilus granarius* (gorgojo de granos) y la cepa Stow de *Cryptolestes ferrugineus* (escarabajo de grano rojo-oxido) de *Cryptolestes ferrugineus*. Los insectos utilizados eran de edad y sexo mixtos. Las tres especies fueron utilizadas simultáneamente dentro de la arena. Los insectos fueron suministrados por la unidad de suministro de invertebrados de Fera y criados de acuerdo con procedimientos operativos estándar Fera (ISU/018 e ISU/034 revisión 3).

#### 40 3.4 Construcción de arenas

- 45 Las arenas se construyeron dentro de la instalación de almacenamiento de granos de Fera. Los insectos fueron confinados a cuadrados de acero galvanizado (500 x 500 x 0.8 mm) dentro de anillos circulares de acero galvanizado (aproximadamente 450 mm de diámetro, 150 mm de altura). La superficie interior del anillo de acero se recubrió con Fluon (Whitford Plastics, UK) para evitar el escape de los insectos. Los anillos se sellaron a la hoja de acero usando decoradores calafatear de modo que los insectos no pudieran llegar debajo del anillo. Se colocó en el centro de cada anillo un refugio hecho de un trozo de conducto eléctrico (25 x 16 x 100 mm), que contenía trigo blando para proporcionar alimento a los insectos, aproximadamente 1 hora después de la introducción de los insectos.

4. Métodos

4.1 Tratamiento de arenas

Los tratamientos fueron los siguientes:

Sin tratamiento (control negativo)

5 Agua (control para K-Obiol)

K-Obiol (control positivo) aplicado a 0.05 litros/m<sup>2</sup>

1 x 10<sup>9</sup> conidios/m<sup>2</sup>

1 x 10<sup>10</sup> conidios/m<sup>2</sup>

1 x 10<sup>11</sup> conidios/m<sup>2</sup>

10 Se asignaron tratamientos a cada arena usando un diseño de bloques al azar. Fueron cinco anillos de repetición para cada tratamiento.

Los conidios se pesaron sobre pequeñas piezas de papel de aluminio, que se doblaron para evitar la pérdida de material durante el transporte al almacén de grano. La cantidad apropiada de material se distribuyó uniformemente a través del área de suelo de los anillos asignados usando un cepillo pequeño.

15 Los controles de K-Obiol y agua se trataron pulverizando la solución para conseguir una cobertura de 0.05 litros/m<sup>2</sup>. Se aplicó un volumen conocido (12.5 ml) de solución de pesticida o agua a los cuadrados de acero usando un pulverizador de laboratorio "De Vilbis" manual (EBGF-047). La pistola de pulverización se mantuvo aproximadamente 20 cm por encima de la superficie del cuadrado y el pesticida o agua se pulverizó sobre la superficie, trabajando progresivamente a través y hacia abajo del cuadrado en movimientos en zigzag, para obtener un tratamiento uniforme a través de la superficie.

20

4.2 Adición de insectos

Los insectos se contaron en el laboratorio, se transportaron en viales y se liberaron en los anillos de acero 24 horas después del tratamiento. Las tres especies estaban presentes dentro de cada uno de los anillos de acero y se utilizaron 50 insectos de cada especie en cada repetición. El refugio que contenía trigo blando se adicionó a la arena aproximadamente una hora después de la introducción de los insectos.

25

4.3 Evaluación de los insectos

La mortalidad de insectos se evaluó después de 14 y 28 días. Los insectos se recogieron de los anillos en tubos de vidrio marcados con la ayuda de un pincel de artista. Se retiraron los reflujos de los anillos y se colocaron en bolsas de plástico auto-selladas etiquetadas. Se registró el número de insectos vivos y muertos de cada especie dentro de cada anillo de acero y el refugio. Los insectos vivos fueron devueltos a los anillos de los cuales fueron retirados después de la evaluación de 14 días para la reevaluación de la mortalidad después de 28 días. Los refugios también fueron devueltos a los anillos de los cuales habían sido retirados.

30

4.4 Control de las condiciones ambientales

La temperatura se controló a lo largo del ensayo usando termopares calibrados (Tipo-T con una punta con reborde y aislado de PTFE (-50 a + 250°C)) unido a un registrador de temperatura 'Squirrel' (modelo no.1045) (EBGF 121/122). Las temperaturas se registraron cada 60 minutos. Los datos fueron descargados y analizados con el software 'SquirrelView'. La temperatura y la humedad también fueron controladas usando registradores de datos Tinytag (TGP 1500. Gemini Dataloggers Ltd, UK) (OPA0/AppEnt 001-003, ubicados en tres de las arenas. Las luces dentro del almacén se encendieron durante el tratamiento y evaluaciones, pero permanecieron apagadas en todos los otros momentos.

35

40

4.5 Análisis estadístico

La diferencia de mortalidad entre tratamientos se analizó mediante un modelo lineal generalizado (GLM) con una función de enlace logit. Las pruebas post-hoc se utilizaron para probar las diferencias entre los tratamientos por comparación de la diferencia significativa mínima para los tratamientos.

45 5. Resultados

5.1 Condiciones ambientales

La temperatura promedio registrada en el almacén de grano durante todo el ensayo fue de 14.3°C con un mínimo de 7.2°C y un máximo de 20.9°C. Hubo muy poca variación en la temperatura observada entre las arenas. La humedad promedio durante el ensayo registrado utilizando los registradores de datos Tinytag fue del 81.7% con un mínimo de 51.2% y un máximo de 98.2%.

5 5.2 Datos de mortalidad de insectos

La aplicación de K-Obiol a la dosis recomendada dio como resultado una mortalidad del 100% de las tres especies de escarabajos ensayadas después de 14 días de exposición. Aunque no se realizó una evaluación exacta, la observación de las arenas después de 24 horas indicó que muchos, si no todos, los escarabajos en las arenas tratadas con K-Obiol estaban muertos. Como el objetivo de este experimento fue determinar las tasas de aplicación eficaz del aislado de *B. bassiana*, el tratamiento de K-Obiol y el control de agua no se incluyeron en el análisis estadístico.

Hubo un efecto altamente significativo del tratamiento con las diferentes dosis de conidios en la mortalidad de las tres especies de escarabajos después de 14 días de exposición (GLM  $F_{3,19} = 79.76$ ,  $P < 0.001$ ,  $F_{3,19} = 31.34$ ,  $P < 0.001$  y  $F_{3,19} = 106.64$ ,  $P < 0.001$  para *S. granarius*, *O. surinamensis* y *C. ferrugineus* respectivamente (Tabla 1). No hubo diferencias significativas en la mortalidad en comparación con el control a las tasas de aplicación más baja ensayada ( $1 \times 10^9$  conidios/m<sup>2</sup>) para *S. granarius* y *O. surinamensis* ( $P > 0.05$ ). Hubo una diferencia significativa en la mortalidad en comparación con el control a las tasas de aplicación más alta ensayada ( $1 \times 10^{11}$  conidios/m<sup>2</sup>) para las tres especies de escarabajos.

La tasa de aplicación intermedia ( $1 \times 10^{10}$  conidios/m<sup>2</sup>) dio como resultado una mortalidad significativa de *S. granarius* y *C. ferrugineus* después de 14 días de exposición. La aplicación de  $1 \times 10^{11}$  conidios/m<sup>2</sup> resultó en los niveles más altos de mortalidad para las tres especies de escarabajos, y esta mortalidad fue significativamente mayor que con  $1 \times 10^{10}$  conidios/m<sup>2</sup>.

Tabla 1. % mortalidad media derivada de insectos 14 días después de la exposición a diferentes tratamientos. El % de mortalidad se expresa en términos del número de insectos recuperados para cada especie. Las cifras entre paréntesis son los intervalos de confianza del 95% derivados.

	<i>S. granarius</i>	<i>O. surinamensis</i>	<i>C. ferrugineus</i>
Control	1.2a (0.2,7.8)	2.6a (0.4, 17.0)	5.2a (2.3,11.7)
$1 \times 10^9$ conidios/m <sup>2</sup>	4.7a (1.8,11.8)	3.6a (0.7,16.4)	22.1b (15.2,31.1)
$1 \times 10^{10}$ conidios/m <sup>2</sup>	31.6b (22.7, 42.1)	13.6a (5.9, 28.0)	68.1c (58.5, 76.4)
$1 \times 10^{11}$ conidios/m <sup>2</sup>	86.0c (77.0, 91.9)	77.5b (62.2, 87.8)	98.8d (93.2, 99.8)

En cada columna, los medios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (GLM;  $P > 0.05$ ).

Hubo un efecto altamente significativo del tratamiento con las diferentes dosis de conidios en la mortalidad de las tres especies de escarabajos después de 28 días de exposición (GLM  $F_{3,19} = 171.61$ ,  $P < 0.001$ ,  $F_{3,19} = 87.14$ ,  $P < 0.001$  y  $F_{3,19} = 54.89$ ,  $P < 0.001$  para *S. granarius*, *O. surinamensis* y *C. ferrugineus* respectivamente (Tabla 2) Las tres tasas de aplicación de conidios resultaron en niveles significativos de mortalidad para *S. granarius* y *O. surinamensis* en comparación con el control ( $P < 0.05$ ). Las tasas de aplicación intermedia y alta resultaron en una mortalidad significativa de *O. surinamensis* en comparación con el control ( $P < 0.05$ ). La aplicación de  $1 \times 10^{11}$  conidios/m<sup>2</sup> resultó en los mayores niveles de mortalidad de las tres especies de escarabajos, y esta mortalidad fue significativamente mayor que con  $1 \times 10^{10}$  conidios/m<sup>2</sup>.

Tabla 2. % de mortalidad media derivada de insectos 28 días después de la exposición a diferentes tratamientos. % de mortalidad se expresa en términos del número acumulado de insectos muertos recuperados después de 14 y 28 días dividido por el total del número de insectos recuperados después de 28 días y el número de insectos muertos después de 14 días. Las cifras entre paréntesis son los intervalos de confianza del 95% derivados.

	<i>S. granarius</i>	<i>O. surinamensis</i>	<i>C. ferrugineus</i>
Control	1.6a (0.4, 5.6)	14.7a (9.0, 23.2)	25.5a (16.4, 37.5)
1x10 <sup>9</sup> conidios/m <sup>2</sup>	13.1 b (8.6, 19.6)	10.8a (6.2, 18.1)	45.4b (34.1, 57.2)
1x10 <sup>10</sup> conidios/m <sup>2</sup>	63.1c (54.9, 70.6)	38.7b (29.9, 48.2)	92.8c (83.9, 96.9)
1x10 <sup>11</sup> conidios/m <sup>2</sup>	97.6d (93.4, 99.1)	96.1 c (89.9, 98.5)	99.6c (86.3, 99.9)

En cada columna, los medios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (GLM;  $P > 0.05$ ).

## 6. Discusión

5 El ensayo se diseñó para determinar la tasa de aplicación eficaz de un polvo de conidios seco de *B. bassiana* IMI398548 para tres especies de escarabajos cuando se aplicó como tratamiento de superficie en un almacén de grano bajo condiciones típicas de UK. Se observó una respuesta a la dosis para las tres especies de escarabajos y esto fue particularmente evidente después de 28 días de exposición a la superficie tratada. La mayor tasa de aplicación utilizada (1x10<sup>11</sup> conidios/m<sup>2</sup>) resultó en una mortalidad significativa de las tres especies de escarabajos después de 14 y 28 días en comparación con el control. La menor tasa de aplicación 1x10<sup>9</sup> conidios/m<sup>2</sup> no resultó en una mortalidad significativa de *S. granarius* u *O. surinamensis* después de 14 días de exposición y ninguna mortalidad significativa de *O. surinamensis* después de 28 días de exposición. De las tres especies de escarabajos ensayadas, *C. ferrugineus* fue la más susceptible al tratamiento con el aislado IMI398548.

En conclusión:

Se necesita una tasa de aplicación mayor de 1x10<sup>9</sup> conidios/m<sup>2</sup> de IMI398548 para el control efectivo de las tres especies de escarabajos ensayadas.

15 Una tasa de aplicación de 1x10<sup>11</sup> conidios/m<sup>2</sup> resultó en mortalidad superior al 96% para las tres especies de escarabajos después de 28 días de exposición.

## Experimento 3

Ensayo a escala piloto de formulaciones de biopesticidas en el almacén de granos - formulación con caolín

### 1. Objetivo

20 Evaluar la formulación de un aislado del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* mezclado con caolín en diferentes concentraciones contra dos especies de insectos cuando se aplica a arenas de acero galvanizado y almacenados en el ambiente de almacén de grano.

### 2. Introducción

25 El objetivo de este estudio fue determinar la efectividad de una formulación en polvo de *B. bassiana* IMI398548 mezclada con caolín y Entostat contra dos especies de escarabajos cuando se aplicó a arenas de acero en el almacén de grano Fera.

### 3. Materiales

#### 3.1 Aislado fúngico

30 El aislado de *B. bassiana* (IMI398548) fue producido por Somycel S.A. usando un método de producción en masa y se verificó utilizando procedimientos internos de control de calidad (QC). El producto final contenía 3,8 x 10<sup>10</sup> conidios/g. El aislado se designó como TA 2654 para los propósitos de este estudio y se almacenó en un refrigerador a 4-8°C.

#### 3.2 Caolín y Entostat

El caolín utilizado fue producido por Opal Omega y suministrado a Fera por Exosect Ltd. El Entostat fue suministrado por Exosect Ltd. Tanto el caolín como Entostat se mantuvieron a temperatura ambiente.

### 3.3 Insectos

5 Se ensayaron dos especies de insectos. Estos fueron la cepa Tram de *Oryzaephilus surinamensis* (escarabajo de grano de dientes de sierra), y la cepa Stow de *Cryptolestes ferrugineus* (escarabajo de grano rojo-óxido). Los insectos utilizados eran de edad y sexo mixtos. Ambas especies fueron utilizadas simultáneamente dentro de la arena. Los insectos fueron suministrados por la unidad de suministro de invertebrados de Fera y criados de acuerdo con procedimientos operativos estándar Fera (ISU/018 revisión 4 e ISU/034 revisión 3).

### 3.4 Construcción de arenas

10 Los insectos se limitaron a cuadrados de acero galvanizado (500 x 500 x 0.8 mm) dentro de anillos circulares de acero galvanizado (aproximadamente 450 mm de diámetro, 150 mm de altura). La superficie interior del anillo de acero se recubrió con Fluon (Whitford Plastics, UK) para evitar el escape de los insectos. Los anillos se sellaron a la hoja de acero usando decoradores calafatear de modo que los insectos no pudieran llegar debajo del anillo. Se colocó en el centro de cada anillo un refugio hecho de un trozo de conducto eléctrico (25 x 16 x 100 mm), que  
15 contenía trigo blando para proporcionar alimento a los insectos, aproximadamente 1 hora después de la introducción de los insectos.

## 4. Métodos

### 4.1 Tratamiento de arenas

Los tratamientos fueron como sigue:

- 20 1. Ningún tratamiento (control)
2. Entostat + caolín (peso igual al utilizado en la formulación IMI398548  $5 \times 10^9$  conidios/m<sup>2</sup> + Entostat + caolín (1:3:20) = Portador bajo
3. Entostat + caolín (peso igual al utilizado en la formulación IMI398548  $1 \times 10^{10}$  conidios/m<sup>2</sup> + Entostat + caolín (1:3:20) = Portador alto
- 25 4. IMI398548  $5 \times 10^9$  conidios/m<sup>2</sup>
5. IMI398548  $1 \times 10^{10}$  conidios/m<sup>2</sup>
6. IMI398548  $5 \times 10^9$  conidios/m<sup>2</sup> + Entostat + caolín (1:3:20)
7. IMI398548  $5 \times 10^9$  conidios/m<sup>2</sup> + Entostat + caolín (1:6:40)
8. IMI398548  $1 \times 10^{10}$  conidios/m<sup>2</sup> + Entostat + caolín (1:3:20)
- 30 Los tratamientos se asignaron a cada arena usando un diseño de bloques al azar. Fueron cinco anillos de repetición para cada tratamiento.

35 Las formulaciones se hicieron pesando los componentes individuales en un vial de vidrio y mezclando usando un mezclador de vórtice. Los conidios y formulaciones requeridos para tratar las arenas se pesaron sobre pequeños trozos de papel de aluminio, los cuales se doblaron cuidadosamente para proteger el contenido durante la transferencia al almacén de grano. La cantidad apropiada de material se distribuyó uniformemente a través del área de suelo de los anillos asignados usando un cepillo pequeño. La cantidad calculada de material adicionado a las arenas para cada tratamiento se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Cantidad calculada de material agregado a las arenas para cada tratamiento.

Tratamiento	Conidios (g)	Entostat (g)	Caolín (g)	Total (g)
Control	0	0	0	0
Portador bajo	0	0.0627	0.418	0.4807
Portador alto	0	0.1254	0.836	0.9614
$5 \times 10^9$ conidios/m <sup>2</sup>	0.0209	0	0	0.0209



1x10 <sup>10</sup> conidios/m <sup>2</sup>	0.0418	0	0	0.0418
5x10 <sup>9</sup> conidios/m <sup>2</sup> 1:3:20	0.0209	0.0627	0.418	0.5016
5x10 <sup>9</sup> conidios/m <sup>2</sup> 1:6:40	0.0209	0.1254	0.836	0.9823
1x10 <sup>10</sup> conidios/m <sup>2</sup> 1:3:20	0.0418	0.1254	0.836	1.0032

#### 4.2 Adición de insectos

5 Los insectos se contaron en el laboratorio, se transportaron en viales y se liberaron en los anillos de acero 24 horas después del tratamiento. Ambas especies estaban presentes dentro de cada uno de los anillos de acero y se usaron 50 insectos de cada especie en cada repetición. El refugio que contenía trigo blando se adicionó a la arena aproximadamente una hora después de la introducción de los insectos.

#### 4.3 Evaluación de los insectos

10 La mortalidad de insectos se evaluó después de 7 días. Los insectos se recogieron de los anillos en tubos de vidrio marcados con la ayuda de un dispositivo de succión con pilas. Se retiraron los reflujos de los anillos y se colocaron en bolsas de plástico autoselladas etiquetadas. Se registró el número de insectos vivos y muertos de cada especie dentro de cada anillo de acero y el refugio.

#### 4.4 Control de las condiciones ambientales

15 La temperatura y la humedad se controlaron usando los registradores de datos Tinytag (TGP 1500. Gemini Dataloggers Ltd, UK) (OPA0/AppEnt 002 y 003) situados en dos posiciones alrededor de las arenas. Las luces dentro del almacén se encendieron durante el tratamiento y evaluaciones, pero permanecieron apagadas en todos los otros momentos.

#### 4.5 Análisis estadístico

20 La diferencia de mortalidad entre tratamientos se analizó mediante un modelo lineal generalizado (GLM) con una función de enlace logit. Las pruebas post-hoc se utilizaron para probar las diferencias entre los tratamientos por comparación de la diferencia significativa mínima para los tratamientos. Cuando las mortalidades de tratamiento fueron 0% o 100%, no se pudo obtener un valor de diferencia significativa mínima y, por lo tanto, no fueron posibles comparaciones post-hoc basadas en la diferencia significativa mínima para estos tratamientos.

### 5. Resultados

#### 5.1 Condiciones ambientales

25 La temperatura promedio registrada en el almacén de grano durante todo el ensayo fue de 15.8°C con un mínimo de 13.1°C y un máximo de 19.5°C. La humedad promedio durante el ensayo registrado utilizando los registradores de datos Tinytag fue de 81.9% con un mínimo de 61.9% y un máximo de 98.8%.

#### 5.2 Datos de mortalidad de insectos

30 Hubo un efecto altamente significativo del tratamiento sobre la mortalidad de *O. surinamensis* y *C. ferrugineus* después de 7 días de exposición (GLM  $F_{7,36} = 11.11$ ,  $P < 0.001$  y  $F_{7,36} = 7.98$ ,  $P < 0.001$ , respectivamente). Véase la Tabla 2, a continuación.

35 La mortalidad en los tratamientos con los conidios solos a tasas de aplicación de 5x10<sup>9</sup> o 1x10<sup>10</sup> conidios/m<sup>2</sup> no fue significativamente diferente de la mortalidad en arenas no tratadas (control) para ya sea *O. surinamensis* o *C. ferrugineus* (Tabla 2). El portador utilizado solo a la misma tasa de aplicación que en los 5x10<sup>9</sup> conidios/m<sup>2</sup> 6:40 y 1x10<sup>10</sup> conidios/m<sup>2</sup> 3:20 (Portador alto) dio como resultado una mortalidad significativa de *O. surinamensis* y *C. ferrugineus* ( $P < 0.05$ ) en comparación con el control (Tabla 2). El portador utilizado solo con la misma tasa de aplicación que en el 5x10<sup>9</sup>/m<sup>2</sup> 3:20 (Portador bajo) dio como resultado una mortalidad significativa de *O. surinamensis* en comparación con los tratamientos de control. Las mayores mortalidades de ambos *O. surinamensis* y *C. ferrugineus* se observaron en los tratamientos con IMI398548, Entostat y caolín (Tabla 2).

Tabla 2. % de mortalidad media derivada de insectos 7 días después de la exposición a diferentes tratamientos. El porcentaje de mortalidad se expresa en términos del número de insectos recuperados para cada especie. Las cifras entre paréntesis son los intervalos de confianza del 95% derivados.

	<i>O. surinamensis</i>	<i>C. ferrugineus</i>
Control	22.6a (8.2, 48.7)	13.83a (3.0, 45.5)
Portador bajo	58.6b (36.7, 77.7)	49.3a,b (25.3, 73.6)
Portador alto	79.4b,c (55.3, 92.3)	86.2b,c (54.7, 97.0)
5x10 <sup>9</sup> /m <sup>2</sup>	19.7a (7.7, 42.0)	20.4a (6.5, 48.5)
1x10 <sup>10</sup> /m <sup>2</sup>	17.2a (6.0, 40.5)	28.4a (11.1, 55.7)
5x10 <sup>9</sup> /m <sup>2</sup> 6:40	91.3b,c (56.9, 98.8)	87.6b,c (52.2, 97.8)
5x10 <sup>9</sup> /m <sup>2</sup> 3:20	93.4c (68.3, 98.9)	90.8c (62.3, 98.3)
1x10 <sup>10</sup> /m <sup>2</sup> 3:20	100	100

En cada columna, los medios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (GLM;  $P > 0.05$ ).

## 6. Conclusiones

Se observaron altos niveles de mortalidad (87-100%) para *O. surinamensis* y *C. ferrugineus* en tratamientos con *B. bassiana* IMI398548, Entostat y caolín después de 7 días de exposición en arenas tratadas.

- 5 El portador entostat y caolín solo resultó en niveles estadísticamente significativos de mortalidad de *O. surinamensis* en ambas tasas de aplicación en comparación con los tratamientos de control y conidios solamente. La mayor cantidad del portador dio el mayor nivel de mortalidad.

- 10 El portador entostat y caolín solo en la tasa de aplicación más alta resultó en un aumento significativo en la mortalidad de *C. ferrugineus* comparado con los tratamientos de control y conidios solamente. La menor tasa de aplicación de entostat y caolín causó casi el 50% de mortalidad de *C. ferrugineus*, pero no fue significativamente diferente de la mortalidad en los tratamientos de control (13.8%).

Lista de procedimientos operativos estándar

ISU 018 revision 3 Procedimiento general de cultivo para escarabajos de productos almacenados

ISU 034 revision 3 Preparación de alimentos y requisitos generales de cultivo dentro de la ISU

- 15 Experimento 4

Ensayo a escala piloto de formulaciones biopesticidas en el almacén de granos-formulación con talco

### 1. Objetivo

- 20 Evaluar la formulación de un aislado del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* mezclado con talco a diferentes concentraciones contra dos especies de insectos cuando se aplica a arenas de acero galvanizado y se almacena en el ambiente de almacén de grano.

### 2. Introducción

El objetivo de este estudio fue determinar la eficacia de una formulación en polvo de *B. bassiana* IMI398548 mezclada con talco y entostat contra dos especies de escarabajos cuando se aplicó a arenas de acero en el almacén de grano Fera.

### 3. Materiales

#### 5 3.1 Aislado fúngico

El aislado de *B. bassiana* (IMI398548) fue producido por Somycel S.A. usando un método de producción en masa y se verificó utilizando procedimientos internos de control de calidad (QC). El producto final contenía  $3.8 \times 10^{10}$  conidios/g. El aislado se designó como TA 2654 y se almacenó en un refrigerador a 4-8°C.

#### 3.2 Silicato de magnesio (talco) y Entostat

10 El silicato de magnesio (talco) utilizado fue suministrado por Alfa Aesar, UK. El Entostat fue suministrado por Exosect Ltd. Tanto el talco como el Entostat se mantuvieron a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C).

#### 3.3 Insectos

15 Se ensayaron dos especies de insectos. Estos fueron la cepa Tram de *Oryzaephilus surinamensis* (escarabajo de grano de dientes de sierra) y la cepa Stow de *Cryptolestes ferrugineus* (escarabajo de grano rojo-óxido). Los insectos utilizados eran de edad y sexo mixtos. Ambas especies fueron utilizadas simultáneamente dentro de la arena. Los insectos fueron suministrados por la unidad de suministro de invertebrados de Fera y criados de acuerdo con procedimientos operativos estándar Fera (ISU/018 revisión 4 e ISU/034 revisión 3).

#### 3.4 Construcción de arenas

20 Los insectos se limitaron a cuadrados de acero galvanizado (500 x 500 x 0.8 mm) dentro de anillos circulares de acero galvanizado (aproximadamente 450 mm de diámetro, 150 mm de altura). La superficie interior del anillo de acero se recubrió con Fluon (Whitford Plastics, UK) para evitar el escape de los insectos. Los anillos se sellaron a la hoja de acero usando decoradores calafatear de modo que los insectos no pudieran llegar debajo del anillo. Se colocó en el centro de cada anillo un refugio hecho de un trozo de conducto eléctrico (25 x 16 x 100 mm), que contenía trigo blando para proporcionar alimento a los insectos, aproximadamente 1 hora después de la introducción de los insectos.

### 4. Métodos

#### 4.1 Tratamiento de arenas

Los tratamientos fueron los siguientes:

1. Ningún tratamiento (control)

30 2. Entostat + talco (peso igual al utilizado en la formulación IMI398548  $5 \times 10^9$  conidios/m<sup>2</sup> + Entostat + talco (1:3:20) = Portador bajo

3. Entostat + caolín (peso igual al utilizado en la formulación IMI398548  $1 \times 10^{10}$  conidios/m<sup>2</sup> + Entostat + talco (1:3:20) = Portador alto

4. IMI398548  $5 \times 10^9$  conidios/m<sup>2</sup>

35 5. IMI398548  $1 \times 10^{10}$  conidios/m<sup>2</sup>

6. IMI398548  $5 \times 10^9$  conidios/m<sup>2</sup> + Entostat + talco (1:3:20)

7. IMI398548  $5 \times 10^9$  conidios/m<sup>2</sup> + Entostat + talco (1:6:40)

8. IMI398548  $1 \times 10^{10}$  conidios/m<sup>2</sup> + Entostat + talco (1:3:20)

40 Los tratamientos se asignaron a cada arena usando un diseño de bloques al azar. Había cinco anillos de repetición para cada tratamiento.

Las formulaciones se hicieron pesando los componentes individuales en un vial de vidrio y mezclándolos utilizando un mezclador de vórtice. Los conidios y formulaciones requeridas para tratar las arenas se pesaron sobre pequeños trozos de papel de aluminio, los cuales se doblaron cuidadosamente para proteger el contenido durante la transferencia al almacén de grano. La cantidad apropiada de material se distribuyó uniformemente a través del área

de suelo de los anillos asignados usando un cepillo pequeño. La cantidad calculada de material añadido a las arenas para cada tratamiento se muestra en la tabla 1

Tabla 1. Cantidad calculada de material agregado a las arenas para cada tratamiento.

Tratamiento	Conidios (g)	Entostat (g)	Talco (g)	Total (g)
Control	0	0	0	0
Portador bajo	0	0.0627	0.418	0.4807
Portador alto	0	0.1254	0.836	0.9614
5x10 <sup>9</sup> conidios/m <sup>2</sup>	0.0209	0	0	0.0209
1x10 <sup>10</sup> conidios/m <sup>2</sup>	0.0418	0	0	0.0418
5x10 <sup>9</sup> conidios/m <sup>2</sup> 1:3:20	0.0209	0.0627	0.418	0.5016
5x10 <sup>9</sup> conidios/m <sup>2</sup> 1:6:40	0.0209	0.1254	0.836	0.9823
1x10 <sup>10</sup> conidios/m <sup>2</sup> 1:3:20	0.0418	0.1254	0.836	1.0032

5 4.2 Adición de insectos

Los insectos se contaron en el laboratorio, se transportaron en viales y se liberaron en los anillos de acero 24 horas después del tratamiento. Ambas especies estaban presentes dentro de cada uno de los anillos de acero y se usaron 50 insectos de cada especie en cada repetición. El refugio que contenía trigo blando se adicionó a la arena aproximadamente una hora después de la introducción de los insectos.

10 4.3 Evaluación de los insectos

Se evaluó la mortalidad de insectos después de 7 días. Los insectos se recogieron de los anillos en tubos de vidrio marcados con la ayuda de un dispositivo de succión con pilas. Se retiraron los refugios de los anillos y se colocaron en bolsas de plástico autoselladas etiquetadas. Se registró el número de insectos vivos y muertos de cada especie dentro de cada anillo de acero y el refugio.

15 4.4 Control de las condiciones ambientales

La temperatura y la humedad se controlaron utilizando registradores de datos Tinytag (TGP 1500. Gemini Dataloggers Ltd, UK) (OPA0/AppEnt 002 y 003) situados en dos posiciones alrededor de las arenas. Las luces dentro del almacén se encendieron durante el tratamiento y las evaluaciones, pero permanecieron apagadas en todos los otros momentos.

20 4.5 Análisis estadístico

La diferencia de mortalidad entre tratamientos se analizó mediante un modelo lineal generalizado (GLM) con una función de enlace logit. Las pruebas post-hoc se utilizaron para probar las diferencias entre los tratamientos por comparación de la diferencia significativa mínima para los tratamientos. Cuando las mortalidades de tratamiento fueron 0% o 100%, no se pudo obtener un valor de diferencia significativa mínima y, por lo tanto, no fueron posibles comparaciones post-hoc basadas en la diferencia significativa mínima para estos tratamientos.

25

5. Resultados

5.1 Condiciones ambientales

La temperatura promedio registrada en el almacén de grano durante todo el ensayo fue de 15.0°C con un mínimo de 9.3°C y un máximo de 19.2°C. La humedad promedio durante el ensayo registrada utilizando los registradores de datos Tinytag fue de 77.6% con un mínimo de 51.1% y un máximo de 95.6%.

30

5.2 Datos de mortalidad de insectos

Hubo un efecto significativo del tratamiento sobre la mortalidad de ambas especies de escarabajos ensayadas después de 7 días de exposición (GLM  $F_{7,36} = 2.42$ ,  $P=0.045$ ,  $F_{7,36} = 44.56$ ,  $P<0.001$  y  $F_{7,36} = 88.61$ ,  $P<0.001$  para *O. surinamensis* y *C. ferrugineus*, respectivamente) (Tabla 2).

5 Las mortalidades más altas para *O. surinamensis* se observaron en los tratamientos con IMI398548, Entostat y talco (Tabla 2). Los tratamientos con conidios y la mayor cantidad de Entostat y talco ( $5 \times 10^9/m^2$  6:40 y  $1 \times 10^{10}/m^2$  3:20) dieron una mortalidad significativamente mayor que el tratamiento con la menor cantidad de Entostat y talco ( $5 \times 10^9/m^2$  3:20) ( $P<0.05$ ). Del mismo modo, se observó una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en la mortalidad de *O. surinamensis* entre los tratamientos de portador bajo y de portador alto, con un menor nivel de mortalidad observado con la menor cantidad de portador (Tabla 1). Los tratamientos con los conidios solos no fueron significativamente diferentes al control ( $P > 0.05$ , Tabla 2).

15 Las mayores mortalidades de *C. ferrugineus* se observaron en los tratamientos con IMI398548, Entostat y talco (Tabla 2). Estos tratamientos dieron una mortalidad significativamente mayor que el control y los tratamientos con los conidios solos ( $P < 0.05$ , Tabla 2). El portador solo (Entostat y talco) también dio una mortalidad significativamente mayor que los tratamientos de control y conidios solamente. Se observó una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en la mortalidad de *C. ferrugineus* entre los tratamientos de portador bajo y portador alto, con un menor nivel de mortalidad observado con la menor cantidad de portador (Tabla 2).

Tabla 2. % de mortalidad media derivada de insectos 7 días después de la exposición a diferentes tratamientos. El porcentaje de mortalidad se expresa en términos del número de insectos recuperados para cada especie. Las cifras entre paréntesis son los intervalos de confianza del 95% derivados.

	<i>O. surinamensis</i>	<i>C. ferrugineus</i>
Control	3.7a (0.9, 14.0)	2.1a (0.4, 9.5)
Portador bajo	35.2b (24.5, 47.7)	70.9b (60.5, 79.4)
Portador alto	53.8c (41.4, 65.8)	88.2c (79.3, 93.6)
$5 \times 10^9/m^2$	5.1a (1.7, 13.9)	10.5a (5.5, 19.2)
$1 \times 10^{10}/m^2$	10.0a (6.1, 22.4)	5.7a (2.4, 13.0)
$5 \times 10^9/m^2$ 6:40	93.6d,e (82.1, 97.9)	100
$5 \times 10^9/m^2$ 3:20	80.2d (69.1, 88.1)	97.6d (91.5, 99.3)
$1 \times 10^{10}/m^2$ 3:20	95.6e (85.1, 98.8)	99.5c,d (88.7, 99.9)

En cada columna, los medios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (GLM;  $P > 0.05$ )

## 6. Conclusiones

20 Se observaron altos niveles de mortalidad (80-100%) para *O. surinamensis* y *C. ferrugineus* en tratamientos con *B. bassiana* IMI398548, Entostat y talco después de 7 días de exposición en arenas tratadas. Para *O. surinamensis* la mortalidad observada en los tratamientos de *B. bassiana* IMI398548, Entostat y talco fue mayor que la mortalidad aditiva de los tratamientos de conidios solos y portadores solos.

El portador de entostat y talco solo dio como resultado niveles significativos de mortalidad para *O. surinamensis* y *C. ferrugineus* en comparación con los tratamientos de control y conidios solos. La mayor cantidad del portador dio el mayor nivel de mortalidad.

Experimento 5

- 5 Ensayos de eficacia a escala de campo de las formulaciones de *Beauveria bassiana* contra plagas de granos almacenados

Resumen

- 10 Se ensayó una formulación en polvo de un biopesticida a base de un aislado (IMI398548) del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, que es activo contra plagas de granos almacenados, en una instalación de almacenamiento de granos en la granja. El tratamiento se aplicó al suelo de dos silos de grano vacíos y luego se introdujeron las plagas de escarabajos objetivo (*Oryzaephilus surinamensis* y *Cryptolestes ferrugineus*) en arenas discretas instaladas en los silos y se controlaron con el tiempo para medir los efectos del tratamiento sobre la mortalidad de insectos. La mortalidad se comparó con dos silos de grano que se dividieron, de modo que la mitad no recibió tratamiento (controles no tratados) y la otra mitad recibió sólo caolín (control de vehículo). Había un silo exterior y un silo interior (dentro de un granero) para cada grupo de tratamiento. La prueba se realizó en el otoño (Sept/Oct). La eficacia se determinó comparando el % de mortalidad total de cada especie en el silo exterior o interior tratado con el % de mortalidad total de cada especie en el silo de control exterior o interior sin tratar en cada punto de control utilizando la fórmula de Schneider-Orelli (Püntener, 1981 Manual for field trials in plant protection second edition. Agricultural Division, Ciba-Geigy Limited.).
- 15
- 20 El % de eficacia en los silos tratados interior y exterior en cada punto de tiempo y para cada especie después del ajuste para la mortalidad control se proporciona en la tabla siguiente. La eficacia fue muy alta (>90% de mortalidad por tratamiento) para las dos especies dentro de 14 días después del tratamiento.

			<i>O. surinamensis</i>	<i>C. ferrugineus</i>
Ajustado por control no tratado	7	interior	51.58	76.83
	días	exterior	5.34	61.14
	14	interior	100	99.05
	días	exterior	100	97.69
Ajustado por el control del vehículo	7	interior	42.86	71.16
	días	exterior	0	36.16
	14	interior	100	97.82
	días	exterior	100	90.93

- 25 En conclusión, en las condiciones de esta prueba, el biopesticida mostró un alto nivel de eficacia para las dos especies diana.

Objetivo

Determinar la eficacia de una formulación en polvo seco de *Beauveria bassiana* cepa IMI398548 contra especies de plagas de productos almacenados.

Introducción

- 30 El propósito de este estudio fue examinar la eficacia de una formulación en polvo de un biopesticida basado en un aislado (IMI398548) del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* contra plagas de granos almacenados bajo condiciones de campo realistas.

- 35 Esta prueba utilizó equipo de aplicación de operador de control de plagas (PCO) realista para aplicar el producto a todo el suelo de silos de granos. Esta prueba incluyó un tratamiento de control de vehículo para el caolín, controlando la mortalidad a los 7 y 14 días y probando la concentración de esporas a una tasa de objetivo baja ( $5 \times 10^9$  conidios totales por  $m^2$ ). Nuestro objetivo es una deposición mínima de  $1 \times 10^9$  CFU/ $m^2$ .

Veinticuatro horas después del tratamiento, se adicionaron grupos de muestra de escarabajos *Oryzaephilus surinamensis* de granos (escarabajo de grano de dientes de sierra) y *Cryptolestes ferrugineus* (escarabajo de grano rojo-óxido) a arenas discretas dentro de las áreas tratadas y se controlaron con el tiempo para la mortalidad.

1. Detalles de los productos del ensayo

Tipo de producto de ensayo: Formulación en polvo seco que contiene conidios de la cepa *Beauveria bassiana* IMI398548, lote Sylvan: 2112003 (código de lote CABI: 142/12; código de lote FERA TA 2672).

Contenido del producto de prueba: Hongos, entostat y caolín

Tasa del producto de ensayo:  $5 \times 10^9$  conidios totales/m<sup>2</sup> (con un mínimo de  $1 \times 10^9$  CFU/m<sup>2</sup>) El lote 2112003 contiene  $5.25 \times 10^{10}$  conidios/g (calculados en CABI) por lo que se necesita aplicar 0.095 g de esporas secas por m<sup>2</sup>. Entostat = 0.768 g/m<sup>2</sup> y caolín = 5.120 g/m<sup>2</sup>.

Proveedor: IMI398548 fue suministrado por CABI de Bakeham Lane, Egham, Surrey, TW20 9TY). El caolín es ópalo grado omega procedente de Goonvean Ltd (St Stephen, St Austell, Cornwall, United Kingdom, PL26 7QF). El Entostat se fabricó en Exosect (lote W1307). Las formulaciones se prepararon en CABI usando un equipo de balanza calibrada, se mezclaron a fondo y se sellaron en una bolsita de aluminio.

5 2. Sitios de ensayo

La prueba incluyó cuatro silos cilíndricos de almacenamiento de granos. Todos los silos tenían paredes corrugadas de metal y pisos de concreto sólido con acceso lateral a través de escotillas o puertas. Dos de los silos estaban ubicados dentro de un granero (5 y 6) y tenían 3.6 m de diámetro y dos estaban situados fuera (7 y 8) y tenían 5.7 m de diámetro.

10 Los insectos fueron cultivados y suministrados por la unidad de suministro de invertebrados en FERA. Los recuentos de mortalidad se realizaron en el sitio FERA.

La formulación se mezcló en el sitio CABI. El trabajo de calibración y validación también se llevó a cabo en CABI.

3. Metodología

8.1. Diseño experimental

15 Había cuatro silos disponibles para el tratamiento, dos dentro de un granero y dos en el exterior. Se utilizó un silo de interior (6) y un silo exterior (7) para los tratamientos de control y los dos silos restantes (5 y 8) se trataron con la formulación fúngica. Cuarenta arenas de acero inoxidable para contener los insectos estaban presentes en cada silo. En los silos de control se cubrieron veinte de las arenas antes del tratamiento (de manera que pudieran mantenerse como controles no tratados y se aplicó el portador caolín en polvo a todo el silo). Se introdujeron los  
 20 insectos en veinte de las arenas en los silos tratados y todas las cuarenta arenas en los silos de control un día después de las aplicaciones de tratamiento. Se recogieron insectos de diez de las arenas de control no tratados, las arenas de control de vehículos y las arenas tratadas después de 7 d y las restantes arenas después de 14 d. Los insectos fueron sometidos a controles de mortalidad. El período de prueba extendido durante un período de 2 semanas.

25 8.2. Calendario de estudio

25/09/2012 - D0	Silos vacíos, cubrir arenas de control no tratadas, aplicar caolín y tratamientos de productos de prueba
26/09/2012 - D1	Arenas de control no tratadas sin cubrir, introducir insectos y refugios para todas las arenas, cubrir todas las arenas con malla, configurar los registradores de datos
03/10/2012 - D8	Recoger los insectos de diez arenas en cada grupo de tratamiento
04/10/2012 - D9	FERA contar insectos vivos y muertos
10/10/2012 - D15	Recoger insectos de las diez arenas restantes de cada grupo de tratamiento, recoger los registradores de datos

11/10/2012 - D16	FERA contar insectos vivos y muertos
30/10/2012	Prueba de limpieza

### 8.3. Preparación del sitio

Antes del comienzo de la prueba, los silos de grano tratados fueron aspirados usando un Numatic HZQ200-2 Hazardous Dust Vacuum Cleaner. Las arenas fueron revisadas y completamente aspiradas para eliminar cualquier insecto restante o polvo de tratamiento del trabajo de la prueba anterior.

### 8.4. Instalación de arena

Se utilizaron cuarenta arenas en los silos 6 y 7 (silos de control) y veinte arenas en los silos 5 y 8 (silos de tratamiento) en esta prueba. Las arenas ya estaban colocadas en la parte superior de banderas de pavimento de hormigón (Marshall FL1200600; 60 x 60 cm), cuatro arenas por bandera (diez banderas por silo) en una disposición 2 x 2. No se usaron dos arenas en cada bandera en los silos 5 y 8. Las arenas se hicieron de anillos de acero inoxidable (Instant Fabrications Ltd, Chandlers Ford, Hants, UK; 20 cm de diámetro, 5 cm de profundidad, 0.9 mm de espesor). Las superficies internas de las arenas se recubrieron con Fluon (Blades Biological, UK) para evitar el escape de los insectos. Las arenas fueron selladas a la bandera de concreto usando sellador de acuario (Geocel Aquaria Aquarium Sealant: Sealants and Tools Direct Ltd) para que los insectos no pudieran llegar por debajo. Una cubierta hecha de material de malla fina y retenida con una banda elástica se colocó sobre cada arena después de la introducción del insecto.

En los silos 6 y 7, las arenas de los bloques 3, 4, 5, 6 y 10 se cubrieron con film transparente y se taparon antes del tratamiento. Estos fueron los controles no tratados y se cubrieron para protegerlos de la deposición de polvo de caolín. En los silos 5 y 8 sólo se utilizaron dos arenas, A y B; A se muestreó a 7 d y B a 14 d. En los silos 6 y 7, A y B fueron muestreados a 7 d y C y D a 14 d. Dentro de los bloques los códigos fueron asignados aleatoriamente a las arenas usando una tabla de números aleatorios.

### 8.5. Calibración del equipo

La aplicación de las formulaciones y los polvos portadores se realizaron usando aplicadores Mini DustR de B&D (Killgerm), uno por silo. Se realizó una calibración para el aplicador.

La naturaleza del mecanismo de bombeo significaba que podía haber variaciones en la cantidad de polvo aplicada desde cada bomba, de este modo se utilizó una posición estándar al aplicar y calibrar. El aplicador se mantuvo en un ángulo de 45° con la boquilla de aplicación en la posición más baja más próxima al suelo. Esto aseguró que el tubo de alimentación dentro de la cámara de polvo estaba cubierto con la cantidad máxima de polvo en todo momento, minimizando de este modo la varianza en las tasas de aplicación. Para asegurar una aplicación uniforme, el aplicador de polvo se movió en un movimiento de "arco" por el aplicador con cada soplado. Esto demostró ser la forma más eficaz de asegurar una cobertura uniforme durante las pruebas de salas de polvo en las instalaciones de CABI. Los resultados de calibración del aplicador mostraron que la cantidad de polvo por soplado se redujo a medida que se vacía el aplicador de polvo, para asegurar de este modo una dispersión uniforme del polvo, el patrón estandarizado de aplicación implicó cubrir todo el suelo del silo en menos de 10 soplos, repitiendo este patrón estandarizado. Esto aseguró una aplicación más uniforme de polvo que si el aplicador hubiera cubierto sistemáticamente el suelo del silo una vez hasta que el aplicador de polvo estuviera vacío.

### 8.6. Recolección de datos ambientales

Se registraron las lecturas diarias media, máxima y mínima de temperatura y humedad para cada silo de granos desde el día de la introducción del insecto. Los registradores de temperatura y humedad calibrados Lascar (modelo EL-USB-2) se colocaron al lado del bloque 9 en cada silo. Las lecturas se recogieron cada 60 min. Los datos fueron descargados y analizados utilizando el software de Lascar.

### 8.7. Aplicación de tratamientos

Se utilizó un aplicador separado para cada tratamiento (cuatro en total: dos tratamientos de ensayo y dos tratamientos de control de vehículo).

Las aplicaciones se realizaron desde el lado lejano del silo (opuesto a la entrada) desde la altura del aplicador con la boquilla dirigida hacia abajo en un ángulo de 45° en un patrón estandarizado, repetida hasta que el aplicador estaba vacío. El tratamiento con caolín sólo se hizo en los silos 6 y 7 a todo el suelo también, comenzando desde el lado más lejos de nuevo. Sólo las arenas en los bloques 1, 2, 7, 8 y 9 recibieron el tratamiento de portador - las otras arenas se cubrieron con film transparente de modo que pudieran usarse para los controles no tratados.



Antes del tratamiento, las escotillas de los silos exteriores se cerraron herméticamente. Los silos interiores tienen puerta de entrada y las puertas han sido retiradas para que los silos se cerraran herméticamente con láminas de polietileno, cartón y cinta adhesiva. Las tuberías de ventilación o los orificios en los silos se cubrieron con láminas de polietileno y cinta adhesiva.

#### 5 8.8. Aplicación y control de insectos

Se ensayaron dos especies de insectos: la cepa Tram de *Oryzaephilus surinamensis* (escarabajo de grano de dientes de sierra), y la cepa Stow de *Cryptolestes ferrugineus* (escarabajo de grano rojo-óxido). Los insectos eran de edad y sexo mixtos. Los insectos fueron suministrados por la unidad de suministro de invertebrados en FERA y criados de acuerdo con los procedimientos operativos estándar FERA (ISU/018, ISU/023, ISU/025, ISU/026, ISU/034).

Los insectos se adicionaron 24 h después de la aplicación de los tratamientos. En los silos 6 y 7 (controles) cada especie se adicionó a todas las arenas. En los silos 5 y 8 sólo las arenas A y B recibieron insectos. Cada arena contenía veinte de cada especie. Se colocó en el centro de cada arena un refugio hecho de un trozo de conducto eléctrico (25 x 16 x 100 mm), que contenía trigo blando para proporcionar alimento a los insectos, aproximadamente 30 minutos antes de la introducción de los insectos.

Los insectos se recogieron a 7 o 14 d usando pooters operados por batería y se transfirieron a viales de vidrio. Los refugios se retiraron de los anillos y se vaciaron en bolsas con cierre de cremallera. Los frascos y las bolsas fueron envasados y enviados por correo durante la noche a FERA para el recuento.

#### 8.9. Análisis de datos

20 Se calculó y se presenta un ajuste para la mortalidad control a la mortalidad media para cada especie de insecto en cada silo de tratamiento en cada punto de tiempo.

### 4. Resultados

#### 9.1. Condiciones ambientales

25 Las condiciones dentro de los silos eran bastante diferentes entre los silos interiores y exteriores, con temperatura y humedad fluctuando en un grado mucho mayor en los silos exteriores; probablemente debido a la exposición al sol y a la falta de aislamiento en el exterior (Tabla 1). Los mínimos y máximos de temperatura fueron más bajos y más altos, respectivamente, en los silos exteriores. Sin embargo, las temperaturas y la humedad media fueron similares entre los silos interiores y exteriores. Las condiciones también fueron similares entre los silos 5 y 6 (interior) y entre 7 y 8 (exterior).

#### 30 9.2. Supervivencia del insecto

Cuando los insectos recogidos estaban siendo revisados para determinar la mortalidad, algunos de ellos faltaban. Parecía improbable que hubieran podido salir, pero en algunas arenas, debido a la ligera superficie desigual, había suficiente espacio debajo de los anillos de acero para permitir que algunos de los escarabajos más pequeños se refugiaran y evitaran ser recogidos en el pooter. Debido a que se recogieron menos de 10 escarabajos de una especie ocasionalmente, y las arenas no son réplicas verdaderas sino muestras, se calculó la mortalidad total en el silo de todas las arenas, en vez de la mortalidad media por arena.

La mortalidad en las arenas de control no tratadas fue notable en cada punto de tiempo para *O. surinamensis* (10-20%) y *C. ferrugineus* (10-30%), particularmente en el silo 7 donde las condiciones eran más cálidas y fluctuaban en mayor grado. Esto podría atribuirse al hecho de que los insectos son criados en laboratorio y utilizados para condiciones controladas constantes. No hubo período de aclimatación debido a que las condiciones en el sitio eran variables, por lo que no pudieron adaptarse a un cambio tan brusco. Una posibilidad adicional es que las condiciones de calor provocaron la volatilización de los residuos tóxicos (confirmados para estar presentes durante el trabajo previo al ensayo) de las superficies del almacén de modo que, aunque los insectos no estuvieran en contacto físico con el suelo del silo, fueron expuestos a bajos niveles de compuestos volátiles que podrían haber afectado su supervivencia.

La supervivencia de *O. surinamensis* y *C. ferrugineus* parecía estar afectada por los polvos portadores, ya que la mortalidad fue mayor que los controles no tratados (27-60% y 28-82% respectivamente), particularmente en el silo 7 donde las temperaturas eran más calientes durante el día.

50 Aunque se puede atribuir cierta mortalidad al portador caolín en polvo, la mortalidad en las arenas que recibieron el tratamiento de formulación completa experimentó los niveles más altos de mortalidad. Esto parecería indicar que la combinación de aislado de *B. bassiana* IMI398548 y caolín con Entostat proporcionó el mejor nivel de control. Con la excepción de una mortalidad inferior a la esperada (24%) en el silo tratado exterior al día 7, la mortalidad de *O.*

*surinamensis* expuesta al tratamiento fue alta (58% al día 7 en el silo 5 y 100% en ambos silos en el día 14). La mortalidad de *C. ferrugineus* también fue alta, incluso después de sólo 7 días (7 d: 72-79% y 14 d: >98%).

El % de eficacia en el silos interiores y exteriores en cada punto de tiempo y para cada especie se calculó utilizando la mortalidad control no tratada y la mortalidad control de vehículo con la fórmula de Schneider-Orelli (Püntener, 1981 Manual for field trials in plant protection second edition. Agricultural Division, Ciba-Geigy Limited.), que se ajusta a la mortalidad control (véase la tabla 2). Debido a que el portador caolín causó cierta mortalidad, el porcentaje ajustado de eficacia utilizando estas cifras es menor. Para examinar el efecto global de la formulación sobre los insectos es mejor examinar el % de eficacia ajustado por los controles no tratados. Para entender el beneficio del hongo en la formulación es mejor examinar el % de eficacia ajustada por la mortalidad control del vehículo.

### 5. Discusión

Esta prueba es una serie de pruebas diseñadas para evaluar la mortalidad de insectos expuestos a un nuevo tratamiento de biopesticida en los silos de almacenamiento de granos. Los insectos se recogieron después de 7 y 14 d y la concentración de esporas adicionadas a la formulación fue como se indicó anteriormente. La decisión de verificar la mortalidad a los 7 d fue beneficiosa, ya que se pudo demostrar que la mortalidad de *O. surinamensis* fue de 20-60% y de *C. ferrugineus* fue del 80-90% en los silos de tratamiento. Es evidente que alguna mortalidad puede ser atribuible a factores distintos del tratamiento porque la mortalidad en los controles no tratados fue entre 10-30% para estas dos especies a los 7 d. Esto puede ser en gran parte atribuible al choque de ser introducido a las arenas puesto que la mortalidad no controlada del control no se aumentó perceptiblemente entre los 7 y 14 d.

Las condiciones ambientales en los silos fueron apropiadas tanto para la supervivencia de los insectos como para la germinación de hongos. Las temperaturas no descendieron por debajo de 5°C y no subieron por encima de 22°C. El aislado sobrevive bien en una amplia gama de temperaturas. La alta humedad (60-90% de RH) ayudará a la germinación inicial del hongo, aunque este aislado tiene menores requerimientos de actividad de agua que otros aislados de *B. bassiana*.

Para un tratamiento biológico, el % de eficacia alcanzado fue elevado para *C. ferrugineus* después de sólo 7 d, particularmente en el silo de interior, y muy alto (>90%) después de 14 d. Para *O. surinamensis* el % de eficacia fue bajo en los silos exteriores después de 7 d, pero notable en el silo de interior (>50%). A los 14 d, el % de eficacia para *O. surinamensis* fue excepcional al 100% tanto en los silos interiores como en los exteriores. Se concluye que la eficacia para las dos especies *O. surinamensis* y *C. ferrugineus* después de sólo 14 d después del tratamiento fue muy buena.

### Tablas

Tabla 1: Temperatura y humedad máximas, mínimas y medias en cada uno de los silos durante el ensayo

Silo	Temperatura			% RH		
	Máx	Min	Media	Máx	Min	Media
5 tratado interior	15.00	9.00	13.02	89.00	71.50	82.13
6 sin tratar interior	15.00	9.00	12.92	89.00	71.00	82.34
7 sin tratar exterior	21.00	4.50	12.99	92.00	54.50	82.56
8 tratado exterior	20.50	4.50	12.96	93.50	61.50	84.96

Tabla 2: % de eficacia en los silos tratados interiores y exteriores en cada punto de tiempo y para cada especie después del ajuste para el control no tratado y la mortalidad control del vehículo usando la fórmula de Schneider-Orelli (Püntener, 1981)

	<i>O. surinamensis</i>		<i>C. ferrugineus</i>	
Ajustado por control no tratado	7	Interior	51.58	76.83
	días	exterior	5.34	61.14
	14	interior	100	99.05

## ES 2 638 220 T3

	días	exterior	100	97.69
Ajustado por el control del vehículo	7	interior	42.86	71.16
	días	exterior	0	36.16
	14	interior	100	97.82
	días	exterior	100	90.93

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término "partículas de electreto" debe entenderse que incluye partículas cargadas electrostáticamente, incluyendo (pero no restringidas a) las partículas de cera producidas por los métodos descritos en este documento anteriormente.

5

Reivindicaciones

1. Una formulación de polvo seco que comprende:
  - 5 i) esporas de un hongo entomopatógeno que tiene actividad contra artrópodos que infestan zonas de almacenamiento de productos secos, en la que las esporas están presentes en una cantidad de 2 a 5% p/p de la formulación;
  - ii) partículas de un mineral industrial en una cantidad de 80 a 88% p/p de la formulación y que tiene un diámetro medio de volumen  $\geq 5 \mu\text{m}$ ; y
  - iii) partículas de electreto en una cantidad de 10 a 15% p/p de la formulación.
- 10 2. Una formulación de polvo seco según la reivindicación 1, en la que las esporas de i) están presentes en una cantidad de 2 a 4.5% p/p; las partículas de ii) están presentes en una cantidad de 82.5 a 87% p/p; y las partículas de electreto de iii) están presentes en una cantidad de 11 a 13% p/p de la formulación.
3. Una formulación según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que las esporas de i) están presentes en una cantidad de 2.10 a 4.17% p/p; las partículas de ii) están presentes en una cantidad de 83.0 a 85.0% p/p y las partículas de electreto de iii) están presentes en una cantidad entre 12.5 a 12.80% p/p de la formulación.
- 15 4. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que las esporas están presentes en una cantidad de al menos  $1 \times 10^9$  CFU/gramo en peso seco.
5. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que las esporas están presentes en una cantidad de al menos  $1 \times 10^{10}$  CFU/gramo en peso seco.
- 20 6. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que las esporas están presentes en una cantidad de al menos  $1 \times 10^{11}$  CFU/gramo en peso seco.
7. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el mineral industrial se selecciona de arcillas, arena, grava, diatomita, tierra de diatomeas, caolín, bentonita, sílice, barita, yeso, y talco o una mezcla de dos o más del mismo.
- 25 8. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el mineral industrial se selecciona entre caolín y talco o una mezcla de los mismos.
9. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que las esporas son del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, cepa IMI 398548.
- 30 10. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que los artrópodos comprenden *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais*, *Rhyzopertha dominica*, *Ahasverus advena*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Prostephanus truncatus* y *Cryptolestes ferrugineus*.
11. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que los artrópodos comprenden *Oryzaephilus surinamensis*, *Sitophilus granarius* y *Cryptolestes ferrugineus*.
12. Un método de producción de formulaciones de polvo seco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende las etapas de
  - 35 i) micronizar partículas de electreto secas;
  - ii) mezclar esporas secas de *Beauveria bassiana* con las dichas partículas de electreto; y
  - iii) mezclar partículas de tierra minerales industriales secas con el producto de la etapa ii).
13. Una formulación de polvo seco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 producida por el método de la reivindicación 12.
- 40 14. Uso de una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 13 para controlar la infestación de artrópodos en una zona de almacenamiento de productos secos (instalación).
- 45 15. Uso de una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 13 para controlar la infestación de artrópodos dentro y/o sobre un producto seco seleccionado de granos enteros y semillas para siembra, granos enteros seleccionados de trigo, arroz, centeno, avena, cebada y maíz para uso como alimento y/o en la fabricación de alimentos procesados, legumbres, frijoles, lentejas y productos elaborados a partir de o elaborados con productos secos, productos procesados en seco, incluyendo pastas, harinas de grano, cuscús, cereales, hierbas secas,

- 5 cereales para el desayuno, sémola, panes, nueces (nueces molidas, en hojuelas y/o enteras), comida de merienda seleccionada de galletas dulces y saladas, patatas fritas, patatas fritas, pretzeles, obleas secas, piensos para el ganado doméstico, madera aserrada, tablones, artículos de madera, incluidos andamios de techos para edificios, paneles, puertas y marcos de puertas, dinteles, zócalos, tableros duros, madera contrachapada, muebles y astillas de madera.
16. Un método de control de la infestación de artrópodos de productos secos en una zona de almacenamiento de productos secos, en el que una formulación de polvo seco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 13 se presenta a las superficies de una zona de almacenamiento de productos secos.
- 10 17. Un método de control de la infestación de artrópodos de productos secos en una zona de almacenamiento de productos secos según la reivindicación 16, en el que una formulación de polvo seco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 13 se presenta a las superficies de una zona de almacenamiento de producto seco mediante i) recolección de la formulación de polvo seco en un aparato de pulverización; y ii) liberación de dicha formulación de polvo seco desde dicho aparato de pulverización hacia dicha zona de almacenamiento de productos secos.