

322081 21



322081

## MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

### PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: INSTITUT PASTEUR

RESIDENCIA: 28 rue du Docteur Roux, Paris (15e) Seine  
Francia,

ENUNCIADO: "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE IN  
SECTICIDAS FUNGICOS PARA LA DESTRUC  
CION BIOLÓGICA DE INSECTOS"

Prioridad: Patente francesa n.º PV 6270 del 19.2.65.



1 Este invento tiene por objeto un procedimiento de pre-  
paración de insecticidas fúngicos destinados, primordialmen-  
te, a la destrucción de insectos, como las termitas princi-  
5 palmente, que caminan por el suelo y atacan a la madera, pu-  
diendo ser igualmente empleados estos insecticidas para la -  
destrucción de otros insectos o incluso de larvas que viven  
en el suelo, donde penetran temporalmente durante ciertas --  
épocas de su existencia.

10 Son conocidos los considerables daños causados por las  
termitas en ciertas regiones tropicales e incluso en Francia,  
donde una forma particular de termita, la "Reticulytermes --  
santonensis", ha producido estragos; se concibe fácilmente -  
el gran interés que presentan unos insecticidas verdaderamen-  
te eficaces y, a este respecto, la invención constituye un -  
15 progreso considerable.

Es bien sabido que los hongos, más particularmente los  
que pertenecen al grupo de los "hyphomicetes", comprenden -  
numerosas especies adaptadas al parasitismo sobre los insecto-  
20 tos, que son designadas con el nombre de hongos entomofitos  
o, mejor, entomófagos.

Los trabajos de diversos autores han permitido llegar  
a la conclusión de que ciertos hongos atacan a órdenes de in-  
sectos variados, lepidópteros, coleópteros, hemípteros, ortop-  
teros, sin presentar una especificidad manifiesta como ocurre  
25 en el caso de las bacterias entomófagas del grupo Cereus.

Los resultados de las investigaciones del inventor pu-  
blicados (C. Toumanoff Ann. Parasitologie humaine et comparée  
II, 129-43, 1933; Sci. Repts. Intern Corn Borer Invest I, 74-  
76), y sobre todo, los inéditos, han convencido a éste de --  
30 que la aplicación de productos a base de hongos entomófagos



1 vivos, cultivados en condiciones apropiadas, presenta un gran  
interés práctico, principalmente contra ciertos isópteros, -  
que viven en el suelo y son atraídos por todas las partes de  
madera de las construcciones, sin despreciar sin embargo, --  
5 cuando las condiciones se prestan a ello, los árboles, sus -  
tocones y su corteza, donde abren galerías, y finalmente las  
plantas cultivadas. Por otra parte, son los árboles, en gene-  
ral, los que constituyen el punto de partida de la infesta--  
ción de las viviendas que pagan un elevado tributo a las exi-  
10 gencias alimenticias de estos insectos.

Por otra parte, han sido realizados en un pasado ya le-  
jano ensayos bastante numerosos sobre insectos variados --  
(Giard: CR Acad. des Sc. 1880, y trabajos diversos de 1880 a  
1896, LE MOULT De la destruction des insectes nuisibles par  
15 les parasites végétaux, BOURGES 1912, FORBES, Illinois agri-  
cult. Exp. Station 1895 F.H. SNOW 21th ann. Report entomol.  
soc. Ontario 1890, TRABUT Gouv. Général de l'Algerie Serv.  
Bot. Inform. Agric.).

Han sido, sin embargo, los trabajos de METCHNIKOFF --  
20 efectuados en Odesa en 1879, seguidos de un primer ensayo de  
aplicación práctica de un producto de parásitos vegetales -  
realizado por KRASSILISTSCHIK (Mem. de la Soc. des Natur. de  
la Nouvelle Russie, XI, 1ª parte 1886, Rev. Génér. d'Agric.  
et de Vinic. merid. 1888) los que han demostrado la eficacia  
25 de un producto que contenga las esporas de un hongo (*Metarrhi-  
zium anisopliae* (Metch) Sorokin) contra las larvas del abe--  
jorro del trigo, que vive en el suelo, y, sobre todo, del --  
gorgojo de la remolacha (*Cleonus punctiventris* Bothynoderes  
*punctiventris* Gal.).

30 Como fácilmente se comprende, la técnica de la produc-

322081

2



1 ción de esporas y el utillaje para el cultivo de los hongos  
utilizados en esta época lejana eran muy primitivos.

5 En nuestros días, y siempre en Rusia, se han efectuado  
ensayos de aplicación de productos a base de los hongos ob-  
tenidos, por otra parte, de una forma totalmente distinta a  
la del procedimiento de esta invención y que, a juzgar por -  
la publicación de 1960, solo han revestido un carácter semi-  
industrial (N.L. ZAKHARCHENKO et al. Instituto de Investiga-  
ciones de la Protección de Plantas, Ministerio de Agricultu-  
10 ra de la Rep. Soc. de Ucrania, 1963).

En Ucrania, la utilización del hongo entomófago ha si-  
do dirigida con éxito contra la dorifora (*Leptinotarsa decim*  
*lineata* Say), siendo la especie utilizada *Beauveria bassiana*  
(Bals) Vuill.

15 El procedimiento objeto del presente invento, con res-  
pecto al que ha sido expuesto o intentado anteriormente, no  
solamente tiene la ventaja de la eficacia en la destrucción  
de los insectos considerados sino también la de que la expe-  
rimentación efectuada con motivo del mismo no han revestido  
20 el carácter único de simples investigaciones de laboratorio  
sino que ha sido llevada sobre el terreno y ha demostrado --  
que se trata de un procedimiento aplicable inmediata y efi--  
cazmente sobre el terreno.

25 El procedimiento de la invención consiste, en princi-  
pio, en efectuar el cultivo de cepas de hongos entomófagos  
vivos, principalmente de los del grupo Hyphomycetes y más --  
particularmente de los géneros *Beauveria* y *Metarrhizium*, en  
presencia de cebos, es decir, de productos cuya naturaleza -  
atraiga de una manera imperiosa, a las termitas y otros in--  
sectos hacia la fuente de infección destinada a destruirlos.  
30



1 El punto de partida de la preparación del producto de  
la invención es, pues, el cultivo de hongos entomófagos del  
grupo Hyphomycetes pertenecientes a los géneros Beauveria y  
Metarrhizium, más exactamente Beauveria bassiana (Bals.) -  
5 Vuill. y Metarrhizium anisopliae (Metch) Sorokin.

Estos hongos, de los que poseemos numerosas cepas pro-  
cedentes de orígenes geográficos diferentes, han sido elegi-  
dos debido al hecho de que atacan frecuentemente a las lar--  
vas de los insectos y también a los insectos adultos que vi-  
ven en el suelo y teniendo en cuenta que a veces forman par-  
te de la flora micósica de los terrenos donde viven sin difi-  
cultar en modo alguno la existencia de las bacterias útiles  
o bien de otros entomófagos. A esta acción podría añadirse  
la ejercida sobre los insectos que viven al aire libre.

15 La ventaja de la utilización de los hongos por intro-  
ducción en el suelo es que éstos no solamente atacan a los  
insectos, como ocurre con las termitas, y los rodean de mico-  
lio que produce los conidios infectantes, sino que estos gé-  
neros de hongos, como han demostrado múltiples ensayos, se  
20 extienden por el terreno que les rodea y pueden permanecer  
en él..

Este procedimiento realiza así el enriquecimiento del  
suelo en las especies que son perjudiciales a los insectos y  
que, como han demostrado los ensayos de laboratorio, no tie-  
nen ningún efecto patógeno sobre los animales ni sobre los -  
25 seres humanos, porque nunca, en ninguna circunstancia, se ha  
podido observar que los hongos mencionados sean agentes de  
las micosis del hombre.

30 Por otra parte, los insectos no pueden prácticamente ad-  
quirir una cierta resistencia, ni la inmunidad, frente a los

322081<sup>21</sup>



1 hongos que los matan por simple contacto o por contacto se--  
guido de la penetración de hifas en la cavidad general. Por  
otra parte, no se debe excluir, en ciertos casos, la infec-  
5 ción "per os", sobre todo cuando el hongo no es muy frecuen-  
te en la naturaleza y son algunas esporas las que penetran -  
en el tubo digestivo del insecto.

A continuación damos un ejemplo de puesta en práctica  
del procedimiento de la invención, a simple título indicati-  
vo y en ningún caso limitativo:

10 En una primera fase, las cepas de hongos entomófagos,  
"Hyphomycetes", seleccionados mediante el estudio de su viru-  
lencia, se cultivan primeramente sobre la gelosa inclinada  
de Sabouraud durante 8 días a 28°C.

15 En una segunda fase, estos tubos, después de control  
de su riqueza en esporas, sirven para inseminar los medios -  
líquidos repartidos en frasquitos del tipo Fernbach.

Estos medios de base tienen la siguiente composición:

Glucosa Massé	20 g.
Bacto-triptona Difco	10 g.
20 Agua, c.s. para	1000 g.

a pH 6, tanto para el *Metarrhizium* como para el *Beauveria*.

El cultivo obtenido durante esta segunda fase es el -  
precultivo que servirá para la inseminación de un aparato in-  
dustrial de 300 litros.

25 Estos precultivos, después de su inseminación, son agi-  
tados durante 72 horas mediante un movimiento rotatorio a --  
210 revoluciones/minuto; durante este periodo son mantenidos  
a la temperatura de 28°C hasta su inoculación en un aparato  
fermentador, del tipo conocido, que permite obtener cultivos  
30 muy abundantes en medio nutritivo aereado y agitado, lo que

322081



1 favorece muy particularmente la obtención de cultivos ricos  
en conidios viables.

El empleo de un fermentador industrial ha permitido -  
realizar una agitación de 1450 revoluciones/minuto aereación  
5 de 2l/min/libre de medio, siendo la temperatura de 28°C y el  
tiempo de cultivo de 86 horas.

El medio de cultivo durante la tercera fase tiene la -  
composición siguiente:

10	Glucosa Massé	20 g.
	Autolizado de levadura	10 g.
	Agua, c.s. para	1000 g.

a pH 4,5, para *Metharrhizium* y de 4 a 5,5 para *Beauveria*.

La numeración de las esporas al final del cultivo ha -  
permitido establecer su número en  $4 \times 10^9$  por ml aproximada-  
15 mente.

La cuarta y última fase ha consistido en obtener una  
mezcla insecticida fácilmente transportable y que pueda ser  
utilizada ya sea en estado seco para espolvorear los lugares  
de desarrollo de las termitas que se alojan sobre todo en --  
20 las partes húmedas, ya sea diluida en agua con objeto de pro-  
ceder a la inyección en el suelo, sobre todo en los lugares  
que puedan servir de punto de partida de la infestación de --  
las viviendas

Con el fin de asegurar la atracción de las termitas, -  
25 los solicitantes han preconizado la adición a los 300 litros  
de medio de cultivo, como cebos, de 6 kg de celulosa o 3 kg  
de serrín de madera, preferentemente madera de pino. Las mani-  
pulaciones ulteriores consisten en:

- 30 1º Ecurrido sobre escurridora de vacío;  
2º Secado en estufa a vacío sobre las bandejas durante 48 h.

322081



1

a 40°C;

3º Molido hasta obtener un polvo homogéneo que contenga  $3 \times 10^7$  esporas/ g aproximadamente.

5

Se ha demostrado que las esporas contenidas en el producto, ya sea en estado líquido o fijadas sobre la celulosa, han dado resultados interesantes que se han traducido en la desaparición de las termitas en el suelo donde las esporas se han introducido en la cantidad de:

10

$1,36 \times 10^9$ ;  $4 \times 10^{10}$ ;  $4,14 \times 10^8$ ;  $4,68 \times 10^9$ ; etc..... por -  
cm<sup>2</sup> según la naturaleza del terreno.

15

Queda bien entendido que la invención no se limita en ningún caso a un método de operación particular para la puesta en práctica del procedimiento, sino que pueden introducirse variantes y perfeccionamientos de los detalles sin salirse por ello de los límites de la invención.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita -  
recaerá sobre las siguientes:

#### REIVINDICACIONES

20

1. Procedimiento de preparación de insecticidas fúngicos para la destrucción biológica de insectos, tales como las termitas principalmente, o incluso de larvas, procedimiento que consiste, en principio, en efectuar el cultivo -  
de cepas de hongos entomófagos vivos, principalmente de los del grupo de los Hyphomicetes y más particularmente de los -  
géneros Beauveria y Metarrhizium, en presencia de cebos, es  
decir, de productos cuya naturaleza atraiga de forma imperiosa a las termitas y otros insectos hacia la fuente de infección destinada a destruirlos.

25

30

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cebo está constituido por celulosa o serrín de

322081

21



1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

madera.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó las reivindicaciones 1 y 2, según el cual las cepas de hongos entomófagos hyphomycetes seleccionadas son cultivadas primero sobre gelosa inclinada de Sabouraud, el cultivo sirve después para insemnar medios usuales de glucosa-peptona, después - este cultivo sirve para insemnar, en un fermentador de gran capacidad, medios que contengan glucosa y un autolizado de levadura, con adición, en las proporciones deseadas, del cebo constituido por celulosa o serrín de madera, siendo finalmente el cultivo así obtenido escurrido en vacío, secado en estufa de vacío y molido el producto seco para la obtención de un polvo muy rico en esporas.

4. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE INSECTICIDAS FUNGICOS PARA LA DESTRUCCION BIOLOGICA DE INSECTOS".

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de nueve páginas mecanografiadas.

Madrid, 21 de enero de 1.966

BERNARDO UNGRIA  
P.P.

Fdo. Juan Pedraza