



Universitat de Lleida

Las atmósferas modificadas integradas con otras tecnologías como alternativas sostenibles para el control de plagas en productos alimentarios almacenados

M^a José Pons i Veiga

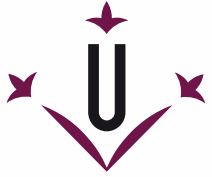
Dipòsit Legal: L.238-2015

<http://hdl.handle.net/10803/288375>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

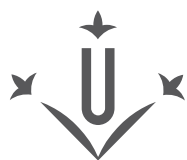
WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida
Departament de Producció
Vegetal i Ciència Forestal

Las atmósferas modificadas integradas con otras tecnologías como alternativas sostenibles para el control de plagas en productos alimentarios almacenados

TESIS DOCTORAL
María José Pons Veiga
Lleida, abril de 2014



Universitat de Lleida
Departament de Producció
Vegetal i Ciència Forestal

Las atmósferas modificadas integradas con otras tecnologías como alternativas sostenibles para el control de plagas en productos alimentarios almacenados

Lleida, abril de 2014

Memoria presentada por M^aJosé Pons Veiga para optar al título de Doctora
Ingeniera Agrónoma por la Universidad de Lleida.

Directores:

Dr. Jordi Riudavets Muñoz
IRTA-Cabrils

Dra. Sonia Guri Baiget
S.E. Carburos Metálicos, S.A.
Grupo Air Products

Tutor:

Dr. Ramon Albajes Garcia
Universitat de Lleida,
Agrotecnio Center

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento al IRTA, *Recerca i Tecnologia Agroalimentàries*, por permitirme realizar esta Tesis en el Subprograma de Entomología.

Quiero agradecer a la empresa S. E. de Carburos Metálicos, S. A. - Grupo Air Products el soporte que me ha mostrado.

Deseo también reconocer y agradecer a todas aquellas personas que con su confianza, apoyo y estímulo, han hecho posible la realización del presente trabajo de investigación:

Al Dr. Jordi Riudavets y a la Dra. Sonia Guri, que como directores de esta Tesis, han estado siempre a mi lado para guiarme, comentando, sugiriendo y aconsejando a lo largo de toda su realización.

Al tutor de la Tesis, el Dr. Ramon Albajes, por sus comentarios, ayuda y colaboración que me ha dispensado en todo momento.

A la Dra. Rosa Gabarra por sus indicaciones y consejos, y por ofrecerme su ayuda en todo momento.

A la Dra. Joaquina Messeguer por sus valiosos comentarios y sugerencias aportadas en la realización y escritura de la Tesis.

Al Dr. Oscar Alomar y a la Dra. Cristina Castañé por la aportación de sus conocimientos científicos para la realización de los ensayos y redacción del capítulo 2.

A la Dra. Judit Arnó y a la Dra. Núria Agustí por sus comentarios y apoyo recibidos a lo largo de estos años.

A la Dra. Lourdes F. Vega, por su gran apoyo y estímulo mostrados en la realización de esta Tesis.

A Silvia Rascón, por su ayuda en la realización de las crías y de los ensayos llevados a cabo en este trabajo.

A Chelo Belda, a Paqui Oliver y a Sonia Malo, por su constante soporte y estímulo.

A Pili Hernández y a Víctor Muñoz, que siempre han solucionado todas las dudas que se me planteaban en las tareas del laboratorio.

A los demás compañeros de laboratorio por su interés y porque de alguna manera también han participado de la realización de este trabajo.

A Teresa Estela por facilitarme todos los trámites administrativos.

En el aspecto más personal, quiero expresar un agradecimiento muy especial a mi familia. Sin ellos no habría podido llegar a este punto. A mis padres, a mis hermanas y al resto de mi familia, por su cariño, comprensión y su apoyo incondicional.

A Gloria Ferrer, a Joana Rosich y a Marc Ferrer, por apoyarme y darme ánimos en todo momento.

A mis amigos, por el soporte que me han dado constantemente.

A Jordi, por su paciencia y comprensión, por estar siempre a mi lado, dándome ánimos y ayudándome en todo momento. Gracias a Jordi.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos: INIA RTA 2005-00068-00-00, INIA RTA 2008-00002-CO2-0, por S. E. de Carburos Metálicos-Air Products Group y por CDTI, Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España, en el marco del proyecto CENIT SOST-CO2 (CEN-2008-1027). Este proyecto CENIT pertenecía al programa Ingenio 2010, y a una subvención del Instituto Nacional de Investigación Agraria i Alimentaria RTA 2011-00025-CO2-01 (FEDER).

RESUMEN

Resumen

Uno de los principales problemas de la industria agroalimentaria es la presencia de plagas de artrópodos en los productos almacenados, que pueden causar daños directos por pérdida de producción y, daños indirectos tanto a nivel económico, porque su presencia en el producto final puede causar desprestigio de la imagen comercial, como a nivel sanitario y medioambiental. A lo largo de los años, el método de control de plagas más utilizado ha sido el control químico. El uso de tratamientos con atmósferas modificadas (AMs) con alta concentración de CO_2 es una alternativa a la utilización de productos químicos residuales que además de altamente efectiva, es respetuosa con el medio ambiente. Sin embargo, las AMs son tratamientos que, a veces, pueden resultar demasiado largos para la industria. Como alternativa a los tratamientos químicos y dentro de una estrategia de control integrado de plagas, en esta tesis se han evaluado los tratamientos con AMs con alta concentración de CO_2 , y el uso de enemigos naturales, así como la sinergia de las AMs con otros bioactivos para el control de estas plagas. Además, se ha determinado cómo afecta la presencia de una de estas plagas sobre la producción de micotoxinas y, si el tratamiento con AMs puede prevenir la producción de estas toxinas. Para ello, en el primer capítulo se evaluaron enemigos naturales de las plagas *Sitophilus oryzae*, *Ephestia kuehniella* y *Plodia interpunctella*, para el control de las mismas, y posteriores tratamientos con AMs con alta concentración de CO_2 , tanto a presión atmosférica como a alta presión. Los resultados obtenidos mostraron un control efectivo de la plaga por parte de los enemigos naturales y un posterior control de la presencia de individuos vivos, plaga o enemigos naturales, después del tratamiento con AMs. Asimismo, con los tratamientos se obtuvo una reducción significativa de los daños producidos por la plaga en el producto. En el segundo capítulo se evaluó si la adición de SO_2 a AMs con una alta concentración de CO_2 , podía incrementar el efecto insecticida de estas AMs para el control de dos especies plaga de alimentos almacenados, *S. oryzae* y *T. confusum*. Los resultados obtenidos demostraron que la adición de 15 000 ppm y 30 000 ppm de SO_2 a AMs con un 95% de CO_2 durante sólo un día de tratamiento, garantizaba un 100% de mortalidad de los adultos de los dos insectos. También se observó que la adición de SO_2 hizo aumentar la mortalidad de los otros estadios de desarrollo de *S. oryzae*. Además, hubo un aumento de la mortalidad de los dos insectos cuando se añadió SO_2 a AMs con un menor contenido de CO_2 , del 70%. En el tercer capítulo se determinó la eficacia de la combinación de AMs y tres bioactivos volátiles (BV), para el control de los adultos del gorgojo *S. oryzae*. Los resultados obtenidos indicaron que la adición de los tres BV incrementó la mortalidad de *S. oryzae* en comparación a la mortalidad producida por las AMs cuando se aplican solas. En el cuarto capítulo, se determinó la producción de micotoxinas en maíz almacenado, debida al crecimiento del hongo *Aspergillus flavus* y favorecida por la presencia del coleóptero *Sitophilus zeamais*, un contenido de humedad inicial elevado del grano de maíz y el efecto protector de las AMs con alta concentración de CO_2 . Los resultados mostraron que la presencia del coleóptero en maíz inoculado con el hongo, favoreció la producción de micotoxinas. Cuando se trató el maíz que contenía *S. zeamais* y el hongo *A. flavus*, con AMs con alta concentración de CO_2 , la producción de micotoxinas se vio reducida significativamente con respecto al maíz con el coleóptero y el hongo sin ser tratado.

Resum

Un dels principals problemes de la indústria agroalimentària és la presència de plagues d'artròpodes en els productes emmagatzemats, les quals poden causar danys directes per pèrdua de producció i, danys indirectes tant a nivell econòmic, perquè la seva presència en el producte final pot causar desprestigi de la imatge comercial, com a nivell sanitari i mediam-biental. Al llarg dels anys, el mètode de control de plagues més utilitzat ha estat el control químic. L'ús de tractaments en atmosferes modificades (AMs) amb alta concentració de CO_2 és una alternativa a l'utilització de productes químics residuals que a més de ser altament efectiva, és respectuosa amb el medi ambient. No obstant això, les AMs són tractaments que, de vegades, poden resultar massa llargs per a la indústria. Com a alternativa als tractaments químics i dins d'una estratègia de control integrat de plagues, en aquesta tesi s'han avaluat els tractaments amb AMs amb alta concentració de CO_2 , i l'ús d'enemics naturals així com la sinergia de les AMs amb altres bioactius per al control d'aquestes plagues. A més, s'ha determinat com afecta la presència d'una d'aquestes plagues sobre la producció de micotoxines i si el tractament en AMs pot prevenir la producció d'aquestes toxines. Per això, en el primer capítol, es van avaluar enemics naturals de les plagues *Sitophilus oryzae*, *Ephestia kuehniella* i *Plodia interpunctella*, per al control de les mateixes i, posteriors tractaments amb AMs amb alta concentració de CO_2 , tant a pressió atmosfèrica com a alta pressió i en AMs. Els resultats obtinguts van mostrar un control efectiu de la plaga per part dels enemics naturals i un posterior control de la presència d'individus vius, plaga o enemics naturals, després del tractament amb AMs. De la mateixa manera, amb els tractaments es va obtenir una reducció significativa dels danys produïts per la plaga en el producte. En el segon capítol, es va avaluar si l'addició de SO_2 a AMs amb una alta concentració de CO_2 podia incrementar l'efecte insecticida d'aquestes AMs per al control de dues espècies plaga d'aliments emmagatzemats, *S. oryzae* i *T. confusum*. Els resultats obtinguts van demostrar que l'addició de 15 000 ppm i 30 000 ppm de SO_2 a AMs amb un 95% de CO_2 durant només un dia de tractament, garantia un 100% de mortalitat dels adults dels dos insectes. També es va observar que l'addició de SO_2 va fer augmentar la mortalitat dels altres estadis de desenvolupament de *S. oryzae*. A més, es va observar un augment de la mortalitat dels dos insectes quan es va afegir SO_2 a AMs amb un menor contingut de CO_2 , del 70%. En el tercer capítol, es va determinar l'eficàcia de la combinació d' AMs i tres bioactius volàtils (BV), per al control dels adults del corc *S. oryzae*. Els resultats obtinguts van indicar que l'addició dels tres BV va incrementar la mortalitat de *S. oryzae*, en comparació a la mortalitat produïda per les AMs quan s'apliquen soles. En el quart capítol, es va determinar la producció de micotoxines en blat de moro emmagatzemat, deguda al creixement del fong *Aspergillus flavus* i afavorida per la presència del coleòpter, *Sitophilus zeamais*, un contingut d'humitat inicial elevat del gra de blat de moro i l'efecte protector de les AMs amb alta concentració de CO_2 . Els resultats obtinguts van indicar que la presència del coleòpter en blat de moro amb el fong va afavorir la producció de micotoxines. Quan es va tractar el blat de moro que tenia *S. zeamais* i el fong *A. flavus*, amb AMs amb una alta concentració de CO_2 , la producció de micotoxines es va veure reduïda significativament respecte al blat de moro amb el coleòpter i el fong sense ser tractat.

Abstract

One of the main problems of the food industry is the presence of arthropod pests in stored products, which can cause direct damages because of the loss of production, and indirect damages, both indirect economic level, because their presence in the final product may cause discredit of the trademark, as well as health and environmental level. Over the years, the pest control method most widely used has been chemical control. The use of modified atmosphere treatments (MAs) with high concentrations of CO₂ is an alternative to the use of residual chemical treatments and in addition to being highly effective, is also environmentally friendly. However, MAs are treatments that sometimes can be too long for the industry. As an alternative to chemical treatments and within a strategy of Integrated Pest Management, in this thesis has been assessed MAs with high CO₂ concentrations and the use of natural enemies, as well as the synergy of MAs with other bioactive for the control of these pests. Furthermore, it has been determined how affects the presence of one of these pests on the production of mycotoxins, and if MAs treatments can prevent the production of these toxins. To do this, in the first chapter natural enemies of pests *Sitophilus oryzae*, *Ephestia kuehniella* and *Plodia interpunctella*, were evaluated to control these pests, and posterior MAs treatments with high concentrations of CO₂, both at atmospheric pressure and at high pressure. The results showed an effective control of the pest by natural enemies and a posterior control of the presence of live individuals, pests or natural enemies, after treatment with MAs. Furthermore, a significant reduction in the damage caused by the pest in the product was obtained with these treatments. In the second chapter, we assessed whether the addition of SO₂ to MAs with a high concentration of CO₂, could increase the insecticide effect of these MAs for pest control of two pest species of stored products, *S. oryzae* and *T. confusum*. The results showed that the addition of 15 000 ppm and 30 000 ppm of SO₂ to MAs with 95% CO₂ for only one day of treatment, guaranteed 100% mortality of adults of the two insects. It was also observed that the addition of SO₂ did increase mortality from other developmental stages of *S. oryzae*. Moreover, an increase in mortality of the two insects was observed when SO₂ was added to MAs with less content of CO₂, 70%. In the third chapter, it was determined the effectiveness of the combination of MAs and three volatile bioactive (VB), to control the adults of the weevil *S. oryzae*. The results showed that the addition of the three BV increased the *S. oryzae* mortality compared to mortality produced by MAs when applied alone. In the fourth chapter, the production of mycotoxins in stored corn was determined, due to the growth of the fungus *Aspergillus flavus* and favored by the presence of the Coleoptera *Sitophilus zeamais*, a high initial moisture content of the corn kernel and the protective effect of MAs with high concentration of CO₂. The results indicated that the presence of *S. zeamais* and the fungus inoculated in corn, favored the production of mycotoxins. When corn with *S. zeamais* and the fungus *A. flavus*, was treated in MAs with high concentration of CO₂, mycotoxin production was significantly reduced, compared with maize with *S. zeamais* and fungus without being treated.

ÍNDICE

ÍNDICE

Agradecimientos	3
Resumen	9
Abreviaturas	23
Introducción general	27
1. Introducción general	29
1.1. Plagas de insectos y ácaros de productos alimentarios almacenados	30
1.2. Hongos en productos alimentarios almacenados	32
1.3. Manejo de plagas en la industria agroalimentaria	32
1.3.1. Tratamientos con atmósferas modificadas con elevado contenido en dióxido de carbono como alternativa a otros métodos de control químico.....	34
Objetivos de la tesis	39
Capítulo 1 - Control biológico y tratamientos con CO₂, para el control de tres especies plaga de alimentos almacenados, <i>Sitophilus oryzae</i> (L.), <i>Ephestia kuehniella</i> Zeller y <i>Plodia interpunctella</i> (Hübner).	43
1. Introducción	45
2. Objetivo	47
3. Material y Métodos.....	47
3.1 Aclimatación de las dietas.....	47
3.2 Crías de los artrópodos a escala de laboratorio	48
3.2.1 Cría de <i>Sitophilus oryzae</i>	48
3.2.2 Cría de <i>Ephestia kuehniella</i>	48
3.2.3 Cría de <i>Plodia interpunctella</i>	48
3.2.4 <i>Trichogramma evanescens</i>	48
3.2.5 Cría de <i>Lariophagus distinguendus</i>	48
3.2.6 Cría de <i>Blattisocius tarsalis</i>	49
3.3 Tratamientos con CO ₂	49
3.4 Evaluación del efecto del control biológico y los tratamientos con CO ₂ para el control de <i>Sitophilus oryzae</i>	50
3.5 Evaluación del efecto del control biológico mediante el parasitoide <i>Trichogramma evanescens</i> y los tratamientos con CO ₂ para el control de <i>Ephestia kuehniella</i> y <i>Plodia interpunctella</i>	52
3.6 Evaluación de la depredación de <i>Blattisocius tarsalis</i> sobre los huevos de <i>Ephestia kuehniella</i> y evaluación del control del depredador mediante el uso de gases	54
3.6.1 Evaluación del efecto del control biológico para el control de <i>Ephestia kuehniella</i>	54
3.6.2 Control de <i>Blattisocius tarsalis</i> con CO ₂ a alta presión y en atmósferas modificadas a presión atmosférica.....	55

3.7. Análisis de resultados.....	56
4. Resultados	57
4.1 Evaluación del efecto del control biológico y tratamientos con CO ₂ para el control de <i>Sitophilus oryzae</i>	57
4.2 Evaluación del efecto del control biológico mediante el parasitoide <i>Trichogramma evanescens</i> y los tratamientos con CO ₂ , para el control de <i>Ephestia kuehniella</i> y <i>Plodia interpunctella</i>	60
4.3 Evaluación de la depredación de <i>Blattisocius tarsalis</i> sobre huevos de <i>Ephestia kuehniella</i> y evaluación del control del depredador mediante el uso de gases	66
4.3.1 Evaluación del efecto del control biológico sobre <i>Ephestia kuehniella</i> , producción de residuos y pérdida de peso de la harina.....	66
4.3.2 Control de <i>Blattisocius tarsalis</i> con CO ₂ a alta presión y en atmósferas modificadas.....	68
5. Discusión.....	70
5.1 Evaluación del efecto del control biológico y los tratamientos con CO ₂ para el control de <i>Sitophilus oryzae</i>	70
5.2 Evaluación del efecto del control biológico mediante el parasitoide <i>Trichogramma evanescens</i> y los tratamientos con CO ₂ , para el control de <i>Ephestia kuehniella</i> y <i>Plodia interpunctella</i>	72
5.3 Depredación de <i>Blattisocius tarsalis</i> sobre <i>Ephestia kuehniella</i>	74
5.4 Tratamientos con CO ₂ sobre <i>Blattisocius tarsalis</i>	75
6. Conclusiones.....	77

Capítulo 2 - Toxicidad de las atmósferas modificadas con alto contenido de dióxido de carbono y adición de dióxido de azufre sobre dos especies plaga de productos alimentarios almacenados: *Sitophilus oryzae* y *Tribolium confusum*

1. Introducción	81
2. Objetivo	83
3. Material y Métodos.....	83
3.1. Crías de los insectos a escala de laboratorio.....	83
3.2. Evaluación de la adición de SO ₂ a atmósferas modificadas con alta concentración de CO ₂ sobre la mortalidad de <i>Sitophilus oryzae</i> y <i>Tribolium confusum</i>	83
3.3. Análisis de resultados.....	85
4. Resultados	85
4.1 Evolución de la concentración de CO ₂ y O ₂	85
4.2. Evaluación de la adición de SO ₂ a atmósferas modificadas con alta concentración de CO ₂ sobre la mortalidad de <i>Sitophilus oryzae</i> y <i>Tribolium confusum</i>	86
5. Discusión.....	90
6. Conclusiones.....	94

Capítulo 3 - Efecto de las atmósferas modificadas y los bioactivos volátiles sobre el gorgojo del arroz, <i>Sitophilus oryzae</i> (L.)	97
1. Introducción	99
2. Objetivo	101
3. Material y Métodos	101
3.1. Cría de <i>Sitophilus oryzae</i> a escala de laboratorio	101
3.2. Evaluación de la combinación de atmósferas modificadas con bioactivos volátiles sobre la mortalidad de <i>Sitophilus oryzae</i>	101
3.3. Análisis de resultados.....	103
4. Resultados	103
4.1. Evolución de la concentración de oxígeno y dióxido de carbono.....	103
4.2. Evaluación de la combinación de atmósferas modificadas con bioactivos volátiles sobre la mortalidad de <i>Sitophilus oryzae</i>	105
5. Discusión.....	107
6. Conclusiones.....	111
Capítulo 4 - Aplicación de atmósferas modificadas para evitar la producción de micotoxinas por parte del hongo <i>Aspergillus flavus</i> Link y favorecidas por la presencia de <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky en maíz almacenado	113
1. Introducción	115
2. Objetivos	116
3. Material y métodos.....	116
3.1. Cría de <i>Sitophilus zeamais</i> a escala de laboratorio	116
3.2. Preparación de la suspensión de esporas de <i>Aspergillus flavus</i>	117
3.3. Efecto de la presencia del gorgojo <i>Sitophilus zeamais</i> sobre la producción de micotoxinas de <i>Aspergillus flavus</i> en maíz (ensayo 1)	117
3.3.1. Determinación de aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2)	119
3.4. Efecto de las atmósferas modificadas sobre el control del gorgojo <i>Sitophilus zeamais</i> y de la producción de micotoxinas de <i>Aspergillus flavus</i> en maíz (ensayo 2).....	120
3.5. Análisis de resultados.....	122
4. Resultados	122
4.1. Efecto de la presencia del gorgojo <i>Sitophilus zeamais</i> sobre la producción de micotoxinas de <i>Aspergillus flavus</i> en maíz (ensayo 1)	122
4.2. Efecto de las atmósferas modificadas sobre el control del gorgojo <i>Sitophilus zeamais</i> y la producción de micotoxinas de <i>Aspergillus flavus</i> en maíz (ensayo 2)..	123
4.2.1. Evolución de la concentración de oxígeno y dióxido de carbono en el interior de las bolsas	123
4.2.2. Evolución de las poblaciones de insectos y micotoxinas.....	124
5. Discusión.....	125

6. Conclusiones.....	127
Conclusiones generales	129
Bibliografía	133

ABREVIATURAS

Abreviaturas

AChE:	Enzima acetilcolinesterasa
AFB1:	Aflatoxina B1
AMp:	Adenosín monofosfato
AM:	Atmósfera modificada
a_w:	Actividad de agua
BV:	Bioactivo volátil
C:	S-(+)-carvona
ch:	Contenido de humedad
GRAS:	<i>Generally Recognized As Safe</i>
HR:	Humedad relativa
L:	Linalol
LC:	Concentración letal
LMRs:	Límite máximo de residuos
L:O:	Luz:Oscuridad
LT:	Tiempo letal
P:	Ácido propiónico

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Introducción general

Los cereales representan la mayor parte del aporte fundamental de calorías en la alimentación humana (FAO, 2014). A nivel mundial, en el año 2012 se produjeron más de 2,5 billones de toneladas de cereales cultivados en unos 700 millones de hectáreas (FAO, 2014). Respecto a esta producción, cabe destacar como principales cultivos, el maíz (*Zea mays* L.) con un 34,4%, seguido del arroz (*Oryza sativa* L.) con un 28,2%, el trigo (*Triticum aestivum* L.) con un 26,5% y la cebada (*Hordeum vulgare* L.) con un 5,2%.

En la Unión Europea, en el año 2012 se cultivaron 57 millones de hectáreas de cereales, en las que se produjeron 280 millones de toneladas. Esta producción representó un 11% de la producción mundial. El país con la mayor producción de cereales fue Francia con un 25,2%, respecto al resto de la Unión Europea. Le siguieron Alemania (15,9%), Polonia (9,8%), Inglaterra (6,9%), Italia (6,6%) y España con una producción de un 6% (FAO, 2014). El resto de países de la UE presentaron porcentajes de producción inferiores al 6%.

A nivel estatal, en el año 2011 se cultivaron 6 millones de hectáreas de cereales, en las cuales se produjeron 21 millones de toneladas. En cuanto a producción, destacó la cebada con un 38,2%, respecto a los otros cereales. Después le siguió el trigo con un 31,7%, el maíz, con un 17,5%, la avena, con un 4,9% y el arroz con un 0,9%. Con porcentajes más pequeños les seguirían el resto de cereales (Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, 2014).

Una vez recolectado, el grano de cereal pasa a ser almacenado. Durante su almacenamiento en silo o almacén, los granos de cereales forman un ecosistema en el cual, es importante conocer las interacciones entre los factores bióticos y abióticos, con el objetivo de identificar los parámetros necesarios para llevar a cabo un manejo óptimo del cereal (Wallace y Sinha, 1981). Los factores bióticos son, mayoritariamente, el propio grano de cereal, la microflora existente en él y, los insectos y los ácaros presentes (Figura 1) (Navarro y Noyes, 2002). Estos factores están interrelacionados entre sí. Entre los factores abióticos, la humedad y la temperatura son muy importantes, ya que de ellos depende el desarrollo de la microflora y los insectos. Otro factor abiótico importante es la composición atmosférica intergranular, ya que, la concentración de oxígeno del aire incide directamente en el desarrollo de insectos y microorganismos (Navarro y Noyes, 2002).

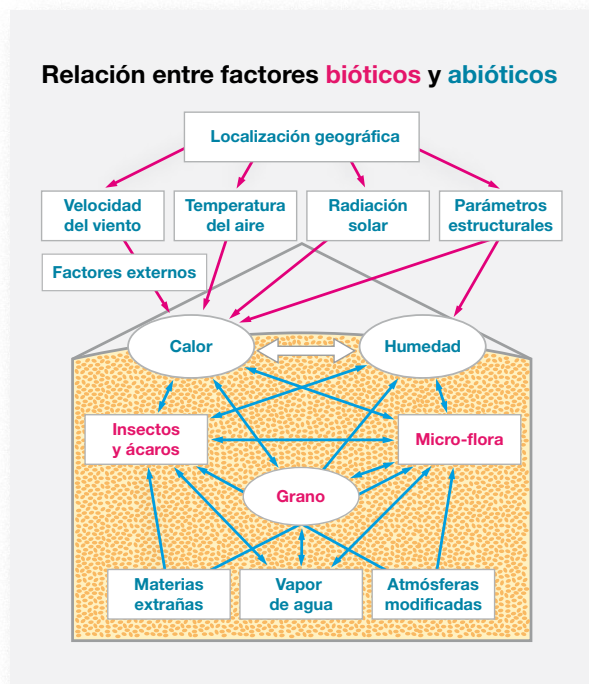


Figura 1: Representación gráfica de las interacciones entre factores bióticos y abióticos en un ecosistema de grano almacenado (adaptado de: Navarro y Noyes (2002))

Si alguno de los factores abióticos mencionados no fuera el óptimo para la conservación del grano de cereal, en éste se podrían producir alteraciones químicas, físicas o biológicas, las cuales podrían hacer disminuir la calidad del cereal. Los principales factores implicados en ellas son:

- Alteraciones químicas: Éstas son el resultado de la respiración del grano durante su almacenamiento. Los factores implicados en este proceso son básicamente, la temperatura, la humedad y la composición gaseosa del ambiente (relación oxígeno (O₂) / dióxido de carbono (CO₂)).
- Alteraciones físicas: Éstas se pueden producir por daños mecánicos y temperaturas elevadas.
- Alteraciones biológicas: Pueden ser debidas, a la presencia de roedores, pájaros, insectos, ácaros y microorganismos (bacterias, hongos y levaduras).

Referente a las alteraciones biológicas, en la Figura 2 se muestra la red trófica que se produciría en el ecosistema alterado del grano de cereal almacenado. También se muestran las interacciones entre los distintos organismos. En la parte izquierda de la Figura 2 se muestran los niveles tróficos (Gorham, 1991).

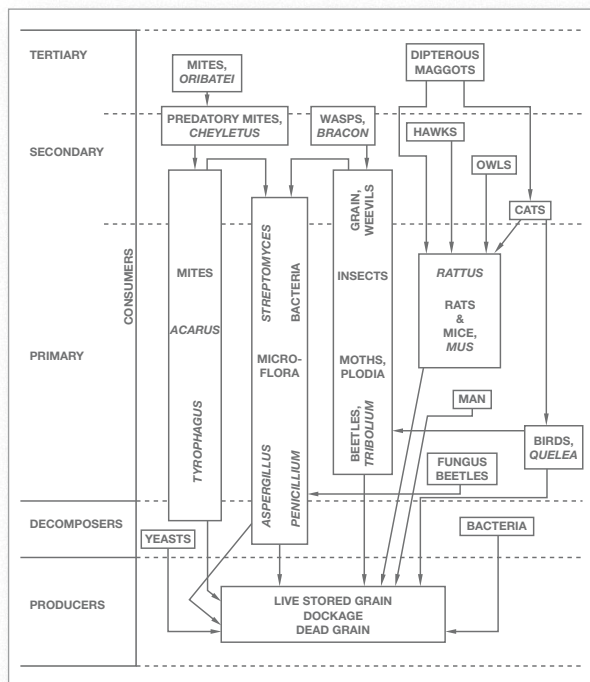


Figura 2: Red trófica del ecosistema del grano de cereal almacenado (Fuente: Gorham (1991)).

En este ecosistema, los niveles tróficos son:

- Productores primarios: grano de cereal.
- Descomponedores: hongos, levaduras, bacterias y ácaros (organismos que degradan y descomponen los organismos muertos o restos de ellos).
- Consumidores:
 - Primarios: seres humanos, ácaros, hongos, bacterias, insectos, ratas, ratones y pájaros (organismos que se alimentan directamente de los productores primarios).
 - Secundarios: enemigos naturales de los insectos y ácaros presentes (parasitoides y depredadores), aves y gatos que atacan a las ratas y los ratones presentes.
 - Terciarios: ácaros que se alimentan de depredadores, y moscas atraídas por la presencia de los roedores y los gatos.

1.1. Plagas de insectos y ácaros de productos alimentarios almacenados

Los insectos plaga de productos alimentarios almacenados son especies que se han adaptado a vivir en ambientes muy secos. A partir de un contenido de humedad del grano de cereal del 10%, y si las condiciones de temperatura son adecuadas, los insectos pueden iniciar la colonización del medio aumentando la población a medida que el contenido de humedad aumenta (Pedersen, 1992). En cambio, los ácaros necesitan ambientes más húmedos para

su desarrollo. Estos ambientes los pueden encontrar, por ejemplo, en almacenes mal acondicionados. La proliferación de los ácaros es más rápida que la de los insectos y si las condiciones ambientales son óptimas, pueden completar el ciclo de huevo a adulto en pocos días (Boczeck, 1991).

En España, entre las especies más importantes de artrópodos que pueden afectar a los granos y sus derivados se encuentran los lepidópteros *Ephestia* spp. y *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), *Sitotroga cerealella* (Oliver) (Lepidoptera: Gelechiidae), los coleópteros como *Tribolium castaeum* (Herbst) y *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus oryzae* (L.), *S. granarius* (L.) y *S. zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae), *Lasioderma serricorne* (Fabricius) y *Stegobium paniceum* (L.) (Coleoptera: Anobiidae), *Oryzaephilus surinamensis* (L.) y *O. mercator* (Fauvel) (Coleoptera: Silvanidae), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) y *C. pusillus* Schönherr (Coleoptera: Cucujidae), *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae), el psócido *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liposcelididae) y el ácaro *Tyrophagus putrescentiae* (Shrank) (Acari: Acaridae) (Riudavets *et al.*, 2002a; Pascual-Villalobos, 2003). Además de los cereales, estas plagas también pueden atacar, entre otros, frutos secos, legumbres, especias, cacao, etc., y alimentos elaborados como la harina, la pasta alimenticia, galletas, chocolate, piensos para ganado, alimentos para animales de compañía, etc. Entre estas especies, se encuentran las que se desarrollan en el interior del grano, y las que se desarrollan externamente y se alimentan del germen y/o de las capas exteriores, así como de harina, granos rotos, etc. (Ebeling, 1996). Entre las especies de desarrollo interno, se encuentran especies de coleópteros de los géneros *Sitophilus* y *Rhyzopertha* así como el lepidóptero *S. cerealella*. En cuanto a las especies de desarrollo externo, se encuentran especies de coleópteros de los géneros *Tribolium*, *Cryptolestes* y *Oryzaephilus*, lepidópteros como *P. interpunctella*, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) y ácaros de los géneros *Tyrophagus*, *Acarus* y *Glyciphagus*.

Las plagas de artrópodos pueden llegar a provocar grandes pérdidas en los cereales durante la post-cosecha, ya sea en cantidad como en calidad del alimento final. En cuanto a las pérdidas directas provocadas por las plagas, éstas pueden llegar a ser de entre un 5% y un 10% de la producción del grano almacenado, en los países desarrollados (Adam *et al.*, 2006). Por ejemplo, en EEUU las pérdidas económicas provocadas por la presencia de insectos y hongos en la producción de trigo pueden ser de millones de dólares por año (Flinn *et al.*, 2003). En los países en vías de desarrollo, que dependen de las reservas de grano almacenado para la alimentación de su población, estas pérdidas pueden llegar a ser del 50% o más de la producción anual (FAO, 2012). Los insectos y ácaros, aparte de consumir parte del grano y contaminarlo, tanto con sus excrementos como con los restos de sus mudas y los individuos muertos, pueden provocar áreas de mayor contenido de humedad, en las pilas de grano, en las que los microorganismos, como por ejemplo los hongos, pueden desarrollarse y producir micotoxinas (Magan *et al.* 2003). Otro punto negativo derivado de la presencia de las plagas de artrópodos y sus subproductos en los alimentos es el efecto tóxico o alérgico que pueden tener sobre la salud de los consumidores finales (Gorham, 1979). En las instalaciones de las fábricas donde se procesan los alimentos, los insectos provocan habitualmente

desperfectos en la maquinaria y obstrucción de cribas y cintas de transporte, por los residuos que éstos producen, como por ejemplo, individuos muertos, exuvios de pupas, excrementos, etc. Además, los tratamientos necesarios para el control de estas plagas, también suponen un gasto económico importante (Phillips y Throne, 2010). Finalmente, se han de añadir las pérdidas económicas que supone para una empresa agroalimentaria, que el producto llegue al mercado con presencia de insectos y/o ácaros o de sus productos, ya que implicaría un desprestigio de su imagen comercial frente al consumidor final.

1.2. Hongos en productos alimentarios almacenados

Los hongos que pueden desarrollarse en los granos de cereal almacenado y que son los más peligrosos tanto para el hombre como para los animales, pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Estos hongos pueden producir micotoxinas, las cuales son metabolitos secundarios tóxicos. Por ejemplo, *Aspergillus flavus* Link (Eurotiales: Trichocomaceae) produce la micotoxina, aflatoxina B1 (AFB1), la cual está clasificada dentro del grupo 1 (cancerígena para humanos) de carcinógenos, por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2014). Por ejemplo, este hongo puede desarrollarse en maíz almacenado, si se dan las condiciones necesarias de humedad y temperatura para su desarrollo.

Los insectos, durante su alimentación, pueden provocar la rotura de las paredes externas del grano de cereal. Estas cubiertas externas son la barrera natural contra el ataque de hongos al grano. A través de las roturas provocadas por los insectos se facilita la propagación de los hongos en el grano de cereal (Sétamou *et al.*, 1998). Asimismo, debido a su constante movimiento, los insectos pueden contribuir a la dispersión de las esporas de hongos, las cuales son transportadas en la superficie del insecto o depositadas mediante sus excrementos (de Saint Georges-Grیدهlet, 1984). En su trabajo, Mc Millian (1983) detectó esporas de *A. flavus* en el interior y encima de adultos del coleóptero *S. zeamais*, los cuales fueron capturados en campos de maíz o en sus alrededores.

1.3. Manejo de plagas en la industria agroalimentaria

Las plagas de artrópodos pueden encontrarse en diferentes puntos del proceso de elaboración y distribución del producto alimentario (Figura 3). Las fases de este proceso que son más susceptibles de ser atacadas por estas plagas son: el almacenado de las materias primas, el proceso de manufacturación, el almacenado de los productos elaborados y la cadena de distribución (Arbogast *et al.*, 2000; Doud y Phillips, 2000; Roesli *et al.*, 2003).

Para evitar o minimizar el ataque de las plagas, se deberían seguir diferentes medidas que podríamos agrupar en los tres pilares siguientes: prevención, inspección y detección y, finalmente, control.

Dentro de la **prevención**, tienen un papel muy importante el control de la temperatura del grano durante su almacenamiento, extremar la higiene de los almacenes y las instalaciones de procesado, el aislamiento entre las zonas de procesado, envasado y almacenamiento del

producto final, para evitar el paso de las plagas de una zona a otra, un diseño correcto de la maquinaria y las instalaciones que permitan la accesibilidad para su limpieza y retirada de residuos, el envasado de los productos manufacturados que evite las contaminaciones cruzadas, y el transporte del producto final, el cual deberá hacerse en vehículos que estén libres de contaminaciones (insectos, bacterias, hongos, etc.), que mantengan unas condiciones ambientales óptimas para el transporte del producto, y su estructura no deberá dañar los envases del producto.

En cuanto a la **inspección y detección**, el objetivo es comprobar si hay presencia de insectos y, si se llegaran a encontrar, determinar qué cantidad hay, la localización de la contaminación, las especies y los estadios del desarrollo presentes, y la dinámica poblacional a lo largo del tiempo.

Finalmente, en los casos necesarios, el **control** de artrópodos puede hacerse llevando a cabo distintas técnicas y métodos de actuación, que muchas veces se utilizan complementariamente, con el objetivo de conseguir los mejores resultados. Estas técnicas y métodos de actuación dentro del concepto del Control Integrado de Plagas (CIP) se dividirían en: control físico, control químico y control biológico.

Hasta hace relativamente pocos años, el método de control de las plagas más utilizado ha sido el **control químico**. No obstante, el número de materias activas registradas como fitosanitarios o biocidas es cada vez más bajo, así como también lo es, el límite máximo de residuos permitido en el producto final (LMRs) (Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente 2014; Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad, 2014). El bromuro de metilo fue una de las sustancias más utilizada para el control de insectos en la materia prima de las industrias agroalimentarias. Sin embargo, este fumigante es uno de los principales causantes de la reducción de la capa de ozono. Por ello, los acuerdos del Protocolo de Montreal prohibieron su uso en los países desarrollados a partir del año 2005 (UNEP, 2006). Actualmente, para el control químico de estas plagas, en España sólo está permitido el uso de algunos insecticidas residuales (piretrinas, metil pirimifos y deltametrin) y las fumigaciones con fosfina (un gas generado a partir de fosforo de aluminio o de magnesio) (Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, 2014). Recientemente se ha registrado en la UE un nuevo fumigante, el fluoruro de sulfurilo, para el tratamiento de almacenes e instalaciones de procesado vacías, pero no está autorizado en la mayoría de países, incluido en España, para el tratamiento directo sobre las materias primas o los productos finales elaborados. La fosfina es pues la única alternativa química que existe para la fumigación de productos agroalimentarios, pero no puede considerarse como tal, ya que necesita tiempos de exposición más

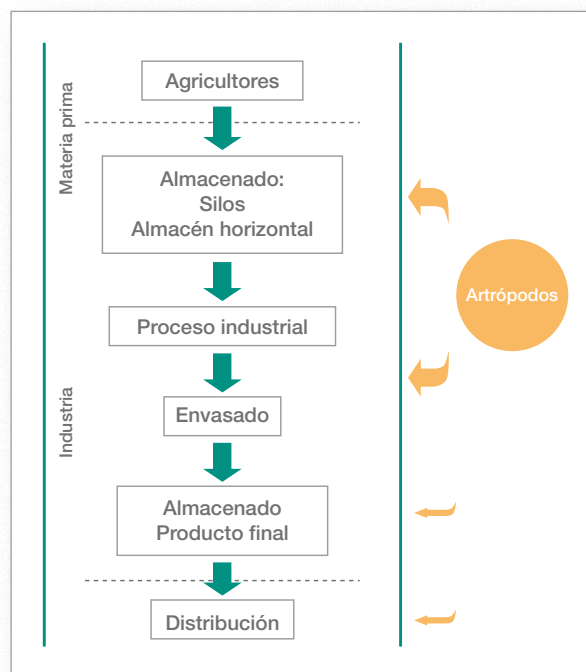


Figura 3: Esquema del proceso de elaboración de alimentos y puntos críticos en los que se puede producir la contaminación por plagas de insectos y ácaros.

largos para ser igualmente efectiva, y no se puede aplicar sobre productos alimentarios una vez que éstos ya han sido elaborados. Por otra parte, un mal uso de este producto, como por ejemplo la aplicación durante tiempos menores a los recomendados, o a temperaturas bajas, ha hecho que en los últimos años hayan aparecido cepas resistentes de diferentes especies de insectos a la fosfina (Navarro *et al.*, 2008). Además, la fosfina es altamente tóxica e incluso puede producir la muerte en humanos, ya que inhibe el transporte de electrones, en la etapa final de la producción de energía en las células (cadena de transporte de electrones), por combinarse con el hierro en presencia de O_2 . El hierro juega un papel muy importante en la cadena de transporte de electrones, ya que puede recoger un electrón y transferirlo de una a otra molécula transportadora en dicha cadena (Garry *et al.*, 1989). Garry *et al.* (1989) también sugirieron que la exposición a la fosfina podría producir alteraciones cromosómicas entre los fumigadores. Alavanja *et al.* (1987), demostraron que trabajadores de una empresa de grano de cereal padecieron cáncer, como consecuencia de la exposición a la fosfina y a otros fumigantes. Como consecuencia, surge la necesidad de desarrollar métodos alternativos, dentro del marco del CIP, para el control de insectos y ácaros que sean eficaces y respetuosos con el medio ambiente.

Entre estos métodos, y dentro del **control químico**, una alternativa de bajo impacto sobre el medioambiente y sobre la salud de las personas, sería la aplicación de atmósferas modificadas (AMs) ya sea con una alta concentración de CO_2 , o con la modificación de la concentración de otros gases atmosféricos como el ozono (O_3), el nitrógeno (N_2) o el O_2 . La utilización de altas concentraciones de O_3 tiene el inconveniente que este gas es altamente corrosivo para la mayoría de los metales utilizados en la industria (Mason *et al.*, 1999). Los tratamientos con N_2 se basan en el desplazamiento del O_2 , produciendo una atmósfera anóxica y, dado que el N_2 no es tóxico de por sí para los insectos, los tiempos de tratamiento requeridos para controlarlos son más largos que con la utilización del CO_2 (Banks y Annis, 1990; Conyers y Bell, 2007; Navarro, 2006). También se encontrarían los métodos de **control físico** (tratamientos térmicos, congelación, secado del producto alimentario para reducir la humedad, exposición a luz ultravioleta, mezcla del grano con tierras diatomeas desecantes, aplicación de radiaciones ionizantes, etc.), y el **control biológico (CB)** mediante el uso de depredadores o parasitoides de las plagas.

Así, el objetivo del CIP es el control de estas plagas, sus restos y los residuos que producen, en la cadena de procesado del producto alimentario, tratando de minimizar el uso de los productos químicos de síntesis. Con la aplicación del CIP se contribuye a retrasar la aparición de resistencias a los productos químicos, y a que se disminuya el riesgo que representan estos productos para la salud humana y el medioambiente.

1.3.1. Tratamientos con atmósferas modificadas con elevado contenido en dióxido de carbono como alternativa a otros métodos de control químico

El CO_2 es un fumigante que se usa como alternativa a los tratamientos con bromuro de metilo, y con otros productos químicos utilizados habitualmente, para el control de plagas de insectos y ácaros, en alimentos almacenados (Adler *et al.*, 2000; Navarro, 2006; Riudavets *et al.*, 2009; Riudavets *et al.*, 2010). El CO_2 puede producir en los artrópodos, acidificación de los fluidos internos, alteración de la permeabilidad de las membranas celulares de las neuronas, reducción de la actividad del corazón y de los músculos alares, modificación de diversas vías metabólicas,

biológicas y de comportamiento, etc. No obstante, el principal efecto que provoca el CO₂ en los insectos y ácaros, es el estímulo en la apertura de los espiráculos. Esta apertura produce una pérdida de agua y, como consecuencia, la muerte del insecto (Nicolas y Sillans, 1989). Cuando la concentración de CO₂ es elevada y la humedad relativa es baja, esta pérdida de agua se ve favorecida.

El almacenaje de la materia prima, sobre todo de cereales y legumbres, en recintos herméticos, hace que se produzca una disminución del O₂ y un aumento del CO₂, debidos a la actividad de los insectos, la microflora y la propia respiración del material vegetal almacenado.

El almacenamiento hermético del grano de cereal ya se hacía en la antigüedad, en fosas subterráneas de las regiones secas y subtropicales de Oriente Medio, y en otras regiones del mundo, como África y la India (Navarro, 2006). El uso de fosas subterráneas para almacenar cereales, aún se utilizaba en los años 40 en Egipto (Attia, 1948; en Navarro, 2006). En 1980, Girish publicó que existían almacenes herméticos muy antiguos que aún estaban en uso, en India. El mismo año, Kamel (1980) (en Navarro, 2006) también describió la existencia de este tipo de almacenes aún operativos, en Yemen, Somalia, Sudan y Egipto.

El método de las AMs aplicado en la actualidad se considera una adaptación del principio en el que se basaban los antiguos almacenes herméticos (Attia, 1948; Hydey Daubney, 1960 en Navarro, 2006).

El término general atmósfera modificada (AM) incluye todos los casos en que la composición de los gases atmosféricos o de sus presiones parciales, crean las condiciones favorables para el control de los insectos plaga de productos almacenados, en los tratamientos realizados en recintos herméticos.

Los aspectos científicos y prácticos de las AMs para conservar alimentos libres de plagas fueron objeto de estudio en los años 50 por Oxley (1948), Bailey (1955) y Hyde *et al.* (1973) (en Navarro, 2006). En 1980, Sigaut publicó que el almacenamiento hermético era uno de los mejores métodos, para mantener grandes cantidades de granos de cereales libres de insectos, durante largos periodos de tiempo, en zonas con clima suave. Sin embargo, el interés por el uso de esta técnica, no se produjo hasta los años 50 y 60 debido, probablemente, a la gran eficacia de los fumigantes que se aplicaban contra las plagas de almacén, en aquella época. En los años 50 y 60, se vio que el uso de estos productos de manera inapropiada, podía dejar residuos en los alimentos, que eran peligrosos para el aplicador y, además, que los insectos podían hacerse resistentes a éstos.

Como consecuencia, en aquellos años, se empezó a investigar sobre el uso de las AMs en Australia y Estados Unidos. Actualmente, la investigación científica sobre las AMs se está llevando a cabo en éstos, y en muchos más países globalmente (Navarro, 2006). El uso comercial de la tecnología de las AMs ha sido muy limitado a lo largo de los años, a pesar de que se ha demostrado eficaz en el ámbito científico. Esta tecnología se utilizaba sólo en aquellos casos, en que el uso de los plaguicidas químicos era inaceptable (Navarro *et al.*, 2004). Ahora bien, en los

últimos años, la técnica de las AMs ha ido evolucionando y, debido a la necesidad de encontrar alternativas al uso de productos químicos residuales, se están aplicando en el ámbito comercial.

Dos de las técnicas de aplicación del CO₂ en AMs, son: a presión atmosférica y a alta presión (de ahora en adelante, CO₂ a alta presión).

La técnica de las AMs a presión atmosférica se basa en aplicar una atmósfera con una concentración de CO₂ elevada. En general, concentraciones de CO₂ superiores al 45% ya muestran eficacia sobre el control de los insectos (Banks y Annis, 1990; Fleurat-Lessard, 1990; Navarro, 2006; Riudavets *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2007). Así, Riudavets *et al.* (2009) definieron las condiciones necesarias para el control de nueve insectos plaga de almacén y un ácaro utilizando la técnica de las AMs con alta concentración de CO₂ (50% o 90%).

La técnica de las AMs a presión atmosférica estaría indicada para mantener la materia prima libre de artrópodos y otras contaminaciones, cuando éste está en los almacenes, silos u otras estructuras metálicas o plásticas herméticamente cerradas, y para evitar las contaminaciones (principalmente de huevos) en los alimentos, cuando éstos ya han sido envasados (Riudavets *et al.*, 2009).

La técnica de CO₂ a alta presión se basa en que el gas se disuelve en gran cantidad en los fluidos internos del artrópodo en un tiempo corto y, en el proceso de descompresión, se produce una rotura de las paredes celulares, debido a la salida del gas de su interior. Sin embargo, al trabajar a alta presión se requiere una inversión en equipos elevada (Riudavets *et al.*, 2010).

Riudavets *et al.* (2004) y Riudavets *et al.* (2010) definieron las condiciones necesarias para el control de ocho insectos plaga de almacén y un ácaro, utilizando la técnica de la aplicación de CO₂ a alta presión (15 o 20 bar), para cada uno de los estadios de desarrollo de los artrópodos.

La técnica del CO₂ a alta presión estaría indicada para el control de las contaminaciones de plagas de la materia prima, cuando entra a fábrica o también, de los productos elaborados, al final de la cadena de fabricación, para asegurar que se envasan y comercializan sin contaminaciones (Riudavets *et al.*, 2010).

Las principales ventajas que tiene el uso de la aplicación de CO₂ en AMs a presión atmosférica o a alta presión son:

- No deja residuos tóxicos en los alimentos tratados.
- No hay necesidad de respetar un plazo de seguridad entre el tratamiento y el consumo del alimento.
- Está permitido como aditivo alimentario (E-290) para preservar la calidad de ciertos alimentos envasados en AMs.
- Puede ser utilizado en producción ecológica.
- El CO₂ de las emisiones de otras industrias podría ser reutilizado en los tratamientos con AMs.

A continuación se muestran los principales inconvenientes del uso de la aplicación de CO₂ en AMs a presión atmosférica o a alta presión:

- Los tratamientos con AMs a presión atmosférica sobre materia prima en silos y almacenes, requieren tiempos de exposición elevados para obtener una buena eficacia insecticida (Banks y Annis, 1990; Riudavets *et al.*, 2009). Además, las estructuras de las instalaciones donde se aplicará el CO₂ deben ser estancas.
- Al aplicar los tratamientos de AMs a presión atmosférica en el envasado final del producto, las elevadas concentraciones de CO₂ podrían variar las cualidades organolépticas y, en determinados alimentos, se podría producir el colapso del envase debido a la disolución del CO₂ en el producto.
- En los tratamientos con CO₂ a alta presión, se necesita una elevada inversión en equipos que, en el caso de productos con bajo valor añadido, podría no ser rentable.

La necesidad de tiempos de exposición largos en los tratamientos con AMs a presión atmosférica implica la necesidad de encontrar alternativas para reducir estos tiempos, sin que ello suponga la pérdida de la eficacia de éstas en el control de los insectos.

OBJETIVOS DE LA TESIS

Objetivos de la Tesis

El objetivo principal de la Tesis fue evaluar métodos alternativos al uso del control químico de plagas de insectos de productos alimentarios almacenados, basados en atmósferas modificadas y su integración con otros métodos de Control Integrado de Plagas, que fueran eficaces y respetuosos con el medio ambiente. Con esta finalidad se plantearon los siguientes objetivos específicos, que se analizaron en los cuatro capítulos de que consta la tesis:

El objetivo del **Capítulo 1** fue evaluar el efecto del control biológico con tratamientos con CO₂, sobre tres especies plaga de alimentos almacenados, *S. oryzae*, *E. kuehniella* y *P. interpunctella*.

El objetivo del **Capítulo 2** fue verificar, si la adición de bajas concentraciones de SO₂ a atmósferas modificadas con alta concentración de CO₂ podía aumentar la eficacia de estas atmósferas modificadas, para el control de dos importantes especies plaga de alimentos almacenados, *S. oryzae* y *T. confusum*, en diferentes sustratos alimentarios.

El objetivo del **Capítulo 3** fue determinar la eficacia de la combinación de atmósferas modificadas con elevada concentración de CO₂ y tres bioactivos volátiles (S-(+)-carvona, linalol y ácido propiónico), para el control de adultos de *S. oryzae*.

El objetivo del **Capítulo 4** fue evaluar la influencia de los daños producidos por el coleóptero *S. zeamais* en granos de maíz almacenado, en la producción de micotoxinas, debida al crecimiento del hongo *A. flavus*. Asimismo, también se pretendió determinar el efecto protector de las atmósferas modificadas con alta concentración de CO₂, sobre la producción de micotoxinas en el maíz almacenado.

CAPÍTULO 1

Control biológico y tratamientos con CO₂, para el control de tres especies plaga de alimentos almacenados, *Sitophilus oryzae* (L.), *Ephestia kuehniella* Zeller y *Plodia interpunctella* (Hübner)



1. Introducción

En España, entre las plagas de insectos más importantes que pueden afectar a la industria agroalimentaria, se encuentran los lepidópteros *E. kuehniella*, *P. interpunctella* y el coleóptero *S. oryzae* (Riudavets *et al.*, 2002a; Pascual-Villalobos, 2003). Estas plagas pueden afectar, entre otros, cereales almacenados, frutos secos y harina. *Ephestia kuehniella* y *P. interpunctella* pueden atacar productos derivados de los cereales procesados, como por ejemplo, la harina o las pastas, mientras que *S. oryzae* prefiere granos enteros de cereales. La aplicación de productos químicos para el control de estas plagas ha sido muy utilizada durante muchos años. Sin embargo, debido a la reducción del número de materias activas registradas como insecticidas, a la aparición de insectos resistentes a estas materias activas, así como a la disminución del LMRs permitidos en el producto final, surge la necesidad de desarrollar métodos que suplan el control químico, dentro del marco del CIP, los cuales sean respetuosos con el medio ambiente. Entre estos métodos se encuentra el CB utilizando enemigos naturales, y la aplicación de CO₂ en AMs, a presión atmosférica o a alta presión.

El CB, se basa en el uso de parasitoides, depredadores o entomopatógenos (van Driesche y Bellows, 1996; Schöller y Prozell, 2003; Navarro, 2004). Entre las ventajas más relevantes del CB, encontramos su eficacia, que no es tóxico ni para el usuario ni para el consumidor del producto final, que no afecta negativamente al medio ambiente, que los enemigos naturales son eficaces en localizar a sus presas, y que no existe riesgo de aparición de resistencias por parte de la plaga, ya que ésta ha co-evolucionado con su enemigo natural. Sin embargo, el CB tiene como inconvenientes que, para liberar los enemigos naturales en el momento más adecuado o evaluar su abundancia, se debe llevar a cabo un control exhaustivo de la población y biología de la plaga, que los enemigos naturales suelen tener una supervivencia limitada, lo que implica en el caso de su liberación, que sólo se podrán guardar durante un periodo de tiempo corto, y a unas condiciones ambientales concretas para su cría y transporte y, además, las regulaciones europeas no permiten la presencia de insectos vivos y, por lo tanto, tampoco de enemigos naturales en los productos alimentarios finales, ya que los insectos y ácaros son considerados, en general, contaminantes.

Entre los enemigos naturales de las plagas de almacén se encuentran insectos del orden Hymenoptera, al cual pertenecen la mayor parte de los insectos parasitoides de insectos. A este orden pertenecen diferentes himenópteros de la familia Pteromalidae, los cuales pueden atacar plagas de desarrollo interno del grano de cereal como, por ejemplo, *S. oryzae*. En un muestreo realizado en Cataluña por Riudavets *et al.* (2002a) se encontraron enemigos naturales pertenecientes a esta familia, entre los cuales había *Lariophagus distinguendus* (Förster) y *Anisopteromalus calandrae* (Howard) (Hymenoptera: Pteromalidae). Entre estas dos especies, *L. distinguendus* se mostró, a nivel de laboratorio, más efectiva que *A. calandrae* para el control del coleóptero *S. oryzae* (Lucas y Riudavets, 2002). En el presente trabajo de investigación, se utilizó *L. distinguendus* como enemigo natural de *S. oryzae*. En cuanto a los himenópteros enemigos naturales de insectos plaga de desarrollo externo del grano de cereal, éstos atacan los huevos, las larvas o las pupas de estas plagas. Dentro de este grupo de parasitoides se

encuentran diferentes especies de *Trichogramma*, como por ejemplo *Tichogramma evanescans* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae), la cual puede parasitar los huevos de lepidópteros como *Cadra cautella* Walker (Lepidoptera: Phycitidae), *E. kuehniella* y *P. interpunctella*, entre otros (Brower, 1988; Daumal *et al.*, 1975). *Trichogramma evanescans* es la especie de parasitoide utilizada en el presente trabajo de investigación, para el control de los lepidópteros *E. kuehniella* y *P. interpunctella*.

Con respecto a los ácaros depredadores de insectos, *Blattisocius tarsalis* (Berlese) (Acarí: Ascidae) es un depredador generalista que puede depredar huevos de ácaros, así como huevos de insectos de los órdenes: Coleoptera, Psocoptera y Lepidoptera. Dentro del orden Lepidoptera, *B. tarsalis* puede depredar los huevos de *E. kuehniella* (Nielsen, 2003; Riudavets *et al.*, 2002b; Haines, 1981). Aparte de depredar huevos de artrópodos, este ácaro también es capaz de atacar a ninfas de primer estadio del psócido *L. bostrychophila* (Riudavets *et al.*, 2002b). *Blattisocius tarsalis* tiene una distribución cosmopolita (Haines, 1981; Chant, 1963), y en el nordeste de España es habitual encontrarlo en cereales almacenados como son el arroz, el trigo, la avena, el centeno y el maíz (Riudavets *et al.*, 2002b).

No obstante, la aplicación del CB tiene el inconveniente de que en el producto final podría haber presencia de insectos vivos, ya sea de individuos de la plaga, que hubieran podido sobrevivir al ataque de los enemigos naturales, como la de los propios enemigos naturales presentes al final del proceso de fabricación. Para evitar este inconveniente, al producto (previamente a ser comercializado) se le tendría que aplicar algún método de control insecticida, que pudiera evitar la presencia de estos insectos. Por ejemplo, a lo largo del periodo de tiempo de almacenamiento del grano de cereal, el CB mediante enemigos naturales, controlaría a la plaga, y al final de este periodo se aplicaría el tratamiento para matar, tanto la plaga superviviente, como a los parasitoides que hubieran quedado. El CB también puede ser aplicado, para el control de las plagas presentes en las instalaciones y maquinaria, donde se almacenan y procesan los alimentos. Cabe decir, que los alimentos finales pueden contaminarse durante su paso por las instalaciones de procesado, tanto de individuos de estas plagas, como de sus enemigos naturales presentes en las instalaciones. El uso de CO₂, ya sea en AMs a presión atmosférica como a alta presión, sería un método de control alternativo al uso de insecticidas, ya que no deja residuos tóxicos en los alimentos ni tampoco necesita un periodo de tiempo de seguridad entre el tratamiento y el consumo del alimento.

En el estudio realizado por Riudavets *et al.*, (2009), se demostró que para controlar los huevos, larvas y pupas de *E. kuehniella* y *P. interpunctella* aplicando tratamientos con AMs, con un 90% de CO₂ y un 3% de O₂, se necesita un tiempo de tratamiento de 4 días. Para el control de *S. oryzae* se necesita un tiempo más largo, concretamente de 12 días (Riudavets *et al.*, 2009). En cambio, al aplicar tratamientos con CO₂ a presión (20 atm), se necesitan tiempos más cortos. Concretamente, para eliminar todos los estadios de desarrollo de *E. kuehniella* se necesitan 15 min de tiempo de tratamiento, mientras que *S. oryzae* se muestra más resistente, necesitando un tiempo de tratamiento de 60 min para eliminar todos los estadios de desarrollo de este coleóptero (Riudavets *et al.*, 2010).

2. Objetivo

El objetivo del presente estudio fue evaluar en condiciones de laboratorio, el control biológico y los tratamientos con CO_2 , de 3 especies plaga de alimentos almacenados, *S. oryzae*, *E. kuehniella* y *P. interpunctella*, para un control efectivo de los mismos. Se pretendió simular cómo evitar tanto la presencia de la plaga como de sus enemigos naturales vivos al final del periodo de fabricación de los alimentos.

3. Material y Métodos

En el presente trabajo de investigación se evaluó el himenóptero *L. distinguendus* para el control del coleóptero plaga *S. oryzae*, el himenóptero *T. evanescens* para el control de los lepidópteros plaga *E. kuehniella* y *P. interpunctella*, y el ácaro depredador *B. tarsalis* para el control de *E. kuehniella*. También se aplicaron tratamientos de AMs a presión atmosférica, con alto contenido en CO_2 , y CO_2 a alta presión para el control de todos los insectos, ya sea las plagas como los enemigos naturales.

Los experimentos realizados en el presente trabajo de investigación se llevaron a cabo en una cámara climática a 25 ± 2 °C de temperatura, $70 \pm 10\%$ de humedad relativa (HR) y un fotoperiodo de 16:8 h luz:oscuridad (L:O).

3.1 Aclimatación de las dietas

Los ingredientes de las dietas de los artrópodos, antes de ser utilizados para preparar las mismas, se congelaban a -20 ± 1 °C durante un periodo de tiempo mínimo de tres días, con el objetivo de evitar posibles contaminaciones de insectos presentes en el grano de origen.

Transcurrido el periodo de congelación, los ingredientes se introducían en una caja de aclimatación, la cual mantenía una HR del 70% durante un periodo de tiempo de 3 semanas, para que éstas se equilibraran a una actividad del agua (a_w) aproximada de 0,75, la cual es óptima para la cría de los insectos. La a_w es la relación que existe entre la presión de vapor del alimento, en relación con la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. La a_w se analizaba con el medidor de a_w Aqualab LITE (Figura 1.1).



Figura 1.1: Medidor de la actividad del agua (a_w), Aqualab LITE

3.2 Crías de los artrópodos a escala de laboratorio

Todas las crías se mantenían en una cámara climática a 25 ± 2 °C de temperatura y 70 ± 10 % de HR y con un fotoperiodo de 16:8 h (L:O).

3.2.1 Cría de *Sitophilus oryzae*

Para la realización del ensayo, se cogieron adultos de *S. oryzae* de la cría que se mantiene desde hace más de 10 años en el laboratorio de Entomología del IRTA de Cabrils.

Cada semana, se preparaban 2 recipientes de cristal aireados de 0,5 L de volumen, con 250 g de arroz integral de cultivo ecológico y 1 mL de adultos de *S. oryzae* en cada uno de ellos. Pasada una semana se retiraban los adultos de los recipientes, y después de 4 semanas se iniciaba la emergencia de los primeros adultos, siendo el momento de máxima emergencia a las 6 semanas después de la puesta de los huevos.

3.2.2 Cría de *Ephestia kuehniella*

Para la realización de los ensayos con *E. kuehniella*, se utilizaron huevos de la cría que se mantiene en el laboratorio de Entomología del IRTA de Cabrils desde el año 2007. Esta cría fue iniciada con individuos que provenían de una empresa de alimentos para animales de compañía, situada en el sur de la provincia de Barcelona.

La dieta de *E. kuehniella* estaba compuesta por harina integral de trigo de cultivo ecológico y levadura de cerveza. Una vez por semana se preparaban 2 recipientes de cristal aireados de 1 L de volumen, con 525 g de la dieta y unos 1200 huevos de 0 a 3 días de edad en cada uno de ellos. Los recipientes preparados se ponían en la cámara de condiciones ambientales controladas durante 7 semanas, momento en el que emergían los adultos.

3.2.3 Cría de *Plodia interpunctella*

Los huevos de *P. interpunctella* utilizados para la realización de los ensayos, se cogieron de la cría que se mantiene en el laboratorio de Entomología del IRTA de Cabrils desde el año 1997. Esta cría fue iniciada con individuos procedentes de distintos almacenes de productos agroalimentarios de Cataluña.

Los ingredientes de la dieta eran: salvado de trigo, levadura de cerveza y glicerina. Para la preparación de la cría de este lepidóptero, se procedía de la misma manera que la de *E. kuehniella* (apartado 3.2.2), a diferencia de que en la cría de *P. interpunctella*, se ponían 150 g de la dieta de este lepidóptero en cada uno de los recipientes de cristal.

3.2.4 *Trichogramma evanescens*

Los adultos de este parasitoide fueron suministrados por la empresa BIP Biologische Beratung Ltd. de Alemania, la cual los cría en huevos de *E. kuehniella*.

3.2.5 Cría de *Lariophagus distinguendus*

Los adultos del parasitoide *L. distinguendus* se cogieron de la cría que se mantiene en el laboratorio de Entomología del IRTA de Cabrils, desde hace 6 años. Esta cría se inició con individuos recogidos de diferentes almacenes de alimentos almacenados de Cataluña.

Una vez por semana, se preparaban 2 recipientes de cristal aireados de 0,5 L de volumen, con 250 g de arroz, el cual contenía larvas de *S. oryzae* de diferentes edades. A continuación, se añadían 10-15 adultos del parasitoide. Después, los botes preparados se ponían en la cámara de condiciones ambientales controladas. La emergencia de los adultos del parasitoide se producía pasados unos 20 días, desde que se ponían los adultos en contacto con la dieta.

3.2.6 Cría de *Blattisocius tarsalis*

Los individuos de *B. tarsalis* utilizados en los diferentes tratamientos se cogieron de la cría que se mantiene en el laboratorio de Entomología del IRTA de Cabrils, desde hace más de 10 años. Esta cría fue iniciada con adultos encontrados en judías infestadas con el coleóptero *A. obtectus*.

Cada semana, se preparaban dos recipientes de plástico aireados, en cada uno de los cuales se ponían 2 g de Vermiculita®, previamente esterilizada en autoclave. A continuación, se ponía un papel con una franja adherente (7,5 x 1,5 cm), sobre el que se ponían unos 400 huevos de *E. kuehniella* previamente congelados. Por último, se introducían unos 20 adultos del ácaro recogidos de recipientes preparados unas tres semanas antes. Una vez preparados, los recipientes se ponían dentro de la cámara de condiciones ambientales controladas.

3.3 Tratamientos con CO₂

Para hacer los tratamientos con AMs a presión atmosférica se utilizaron bolsas de plástico Cryovac BB4L de 300 X 210 mm, un mezclador de gases Witt KM 100-3M/MEM (Figura 1.2), una envasadora MULTIVAC A 300/16 (Figura 1.3) y un analizador de gases Abiss modelo TOM 12 (Figura 1.4 A). Los gases utilizados eran: CO₂, O₂ y N₂, los cuales estaban en botellas (S.E. Carburos Metálicos, S. A. - Air Products Group).

En los tratamientos con CO₂ a alta presión se utilizó una cámara de alta presión (S.E. Carburos Metálicos, S. A. - Air Products Group), el volumen de la cual era de 2,2 m³ (Figura 1.4 B) y estaba conectada a un tanque de CO₂.



Figura 1.2: Mezclador de gases Witt KM 100-3M/MEM



Figura 1.3: Envasadora MULTIVAC A 300/16



Figura 1.4: (A) Analizador de gases Abiss modelo TOM 12; (B) Cámara de alta presión instalada en IRTA (Cabrlis).

3.4 Evaluación del efecto del control biológico y los tratamientos con CO₂ para el control de *Sitophilus oryzae*

Previamente a la preparación de las repeticiones, se pusieron en contacto unos 7 kg de arroz con 410 adultos de *S. oryzae*/kg de arroz, repartidos en 7 recipientes de plástico aireados, de 2 L de volumen (Figura 1.5 (A) y Figura 1.6). Éstos se colocaron en la cámara de condiciones ambientales controladas y cada día se rotaba el recipiente, con el objetivo de que las hembras pudieran poner los huevos homogéneamente en el arroz. Pasada una semana, se retiraron los adultos, y el arroz con los huevos del coleóptero se repartió en 84 repeticiones (83 g/repetición), que eran recipientes de cristal aireados de 0,5 L de volumen (Figura 1.5 (B)). Para cada tratamiento se prepararon 14 repeticiones.



Figura 1.5: (A) Recipiente de 2 L de volumen, utilizado para la infestación de arroz con huevos de *S. oryzae*. (B) Recipiente de cristal de 0,5 L de volumen, utilizado en los tratamientos para el control de *S. oryzae*.

Los tratamientos que se hicieron y la nomenclatura utilizada (entre paréntesis), son los que se indican a continuación:

-
- Arroz con *S. oryzae* (Testigo)
 - Arroz con *S. oryzae* y *L. distinguendus* (Biológico)
 - Arroz con *S. oryzae* tratado con CO₂ con AMs a presión atmosférica (AMs)
 - Arroz con *S. oryzae* tratado con CO₂ a alta presión (Presión)
 - Arroz con *S. oryzae* y *L. distinguendus* tratado con CO₂ con AMs a presión atmosférica (Biológico + AMs)
 - Arroz con *S. oryzae* y *L. distinguendus* tratado con CO₂ a alta presión (Biológico + Presión)

Al cabo de 7 días de haber introducido el arroz en los recipientes de cristal, se añadieron 10 adultos del parasitoide *L. distinguendus* (7 hembras y 3 machos) en las repeticiones de los tratamientos Biológico, Biológico + AMs y Biológico + Presión. Pasada una semana, después de haber puesto los parasitoides en contacto con el arroz, se procedió a hacer los tratamientos con AMs a las repeticiones de los tratamientos: AMs y Biológico + AMs, y los tratamientos con CO₂ a presión a las repeticiones de los tratamientos: Presión y Biológico + Presión. Después, las muestras se volvieron a poner en la cámara de condiciones ambientales controladas. Al día siguiente, se retiraron los parasitoides de los recipientes de los tratamientos: Biológico y Biológico + Presión. Los parasitoides de las repeticiones de los tratamientos AMS y Biológico + AMs se retiraron pasados 12 días, ya que era el momento en el que se abrían las bolsas que contenían cada una de las repeticiones con la AM. Previamente a abrir las bolsas, se analizaba la concentración de CO₂ y O₂ del interior de éstas. Ese mismo día, se contaron los adultos del coleóptero y los del parasitoide que hubieran podido emerger. Concretamente, el recuento de los adultos del coleóptero se hizo de las repeticiones de todos los tratamientos, mientras que el recuento de los parasitoides se hizo de las repeticiones de los tratamientos: Biológico, Biológico + AMs y Biológico + Presión. A partir de este día y durante 6 semanas más, se fueron contando los adultos de los insectos plaga y del parasitoide que habían emergido, semanalmente (Figura 1.6).

Los procedimientos seguidos para la realización de los tratamientos con AMs a presión atmosférica y con CO₂ a alta presión son los que se exponen a continuación:

En los tratamientos con AMs a presión atmosférica, el contenido de cada una de las repeticiones de los tratamientos AMs y Biológico + AMs, se introdujo en las bolsas impermeables a los gases. A continuación, con la envasadora se procedió a hacer el envasado con AMs con la mezcla de gases $86,37 \pm 1,64\%$ CO₂ / $2,49 \pm 0,26\%$ O₂ / $11,14 \pm 1,7\%$ N₂, la cual había sido preparada previamente con el mezclador de gases, dentro de un pulmón. Después, las bolsas se pusieron dentro de la cámara climática durante 12 días. Pasado este tiempo, se analizaron las concentraciones de CO₂ y O₂ del interior de las bolsas, a continuación, éstas se abrieron y el contenido de cada una de ellas se puso en el mismo tipo de recipiente utilizado inicialmente. Después, estos recipientes se volvieron a poner en la cámara climática (Figura 1.6).

En los tratamientos con CO₂ a alta presión (Presión y Biológico + Presión), los recipientes de cristal, previamente preparados con 83 g de arroz infestado con el coleóptero *S. oryzae* y también con el parasitoide, en el caso del tratamiento Biológico + Presión, se pusieron dentro de la cámara de alta presión. Ésta se cerró y se procedió a introducir el CO₂ del tanque que

estaba conectado a la cámara, hasta llegar a 20 atm de presión en el interior de ésta. Cuando se llegó a la presión de 20 atm, ésta se mantuvo durante 60 min. Pasado este tiempo, se procedió a hacer la descompresión, la cual era de 30 s. A continuación, la cámara se abrió y las muestras se pusieron en la cámara climática. Pasadas 24 h, se procedió a retirar los adultos del parasitoide. Después, los recipientes con el arroz se volvieron a poner en la cámara climática (Figura 1.6).

Al final de los tratamientos, aparte de hacer el recuento del número de adultos de *S. oryzae* y de *L. distinguendus* que habían emergido a lo largo del estudio, como medida del daño producido por la plaga, la última semana del recuento (semana 10) se pesó el arroz de cada una de las repeticiones, para calcular la pérdida de peso que se había podido producir.

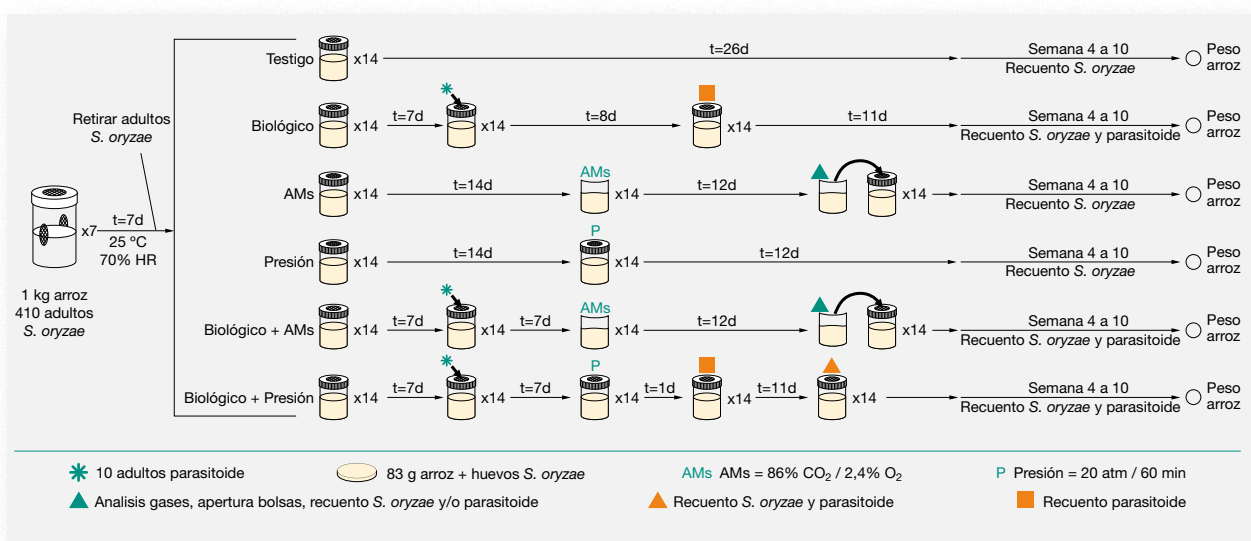


Figura 1.6: Esquema del procedimiento seguido en el ensayo de evaluación del efecto del control biológico y los tratamientos con CO₂ para el control de *S. oryzae*.

3.5 Evaluación del efecto del control biológico mediante el parasitoide *Trichogramma evanescens* y los tratamientos con CO₂ para el control de *Ephestia kuehniella* y *Plodia interpunctella*

El método llevado a cabo en la realización de los tratamientos, tanto para *E. kuehniella* como para *P. interpunctella* fue el mismo.

Para cada tratamiento se prepararon 14 cajitas de plástico transparentes y aireadas como repeticiones (Figura 1.7). Las medidas de las cajitas eran: 39 mm de altura y 73 mm de diámetro. La tapa tenía un agujero de 40 mm de diámetro el cual estaba tapado con una malla metálica de 0,3 mm de luz. La harina utilizada en este ensayo era harina integral de trigo de cultivo ecológico.

Los tratamientos que se hicieron y la nomenclatura utilizada (entre paréntesis), son los que se indican a continuación:

- Harina con *E. kuehniella* o *P. interpunctella* (Testigo)
- Harina con *E. kuehniella* o *P. interpunctella* y *T. evanescens* (Biológico)
- Harina con *E. kuehniella* o *P. interpunctella* tratados con CO₂ con AMs a presión atmosférica (AMs)
- Harina con *E. kuehniella* o *P. interpunctella* tratados con CO₂ a presión (Presión)
- Harina con *E. kuehniella* o *P. interpunctella* y *T. evanescens* tratados con CO₂ con AMs a presión atmosférica (Biológico + AMs)
- Harina con *E. kuehniella* o *P. interpunctella* y *T. evanescens* tratados con CO₂ a presión (Biológico + Presión)

En cada una de las cajitas se colocó un papel (1,2 cm x 0,5 cm) con una de sus caras adherente, sobre la cual se pusieron 215 huevos de *E. kuehniella* o *P. interpunctella* de 0 a 4 días de edad. Seguidamente, se añadieron 24 adultos de *T. evanescens* a cada una de las cajitas en los tratamientos Biológico, Biológico + AMs y Biológico + Presión. A continuación, las cajitas preparadas se pusieron en la cámara de condiciones ambientales controladas. Pasados 3 días, los papeles con los huevos del lepidóptero se colocaron en el mismo tipo de cajitas pero, cada una de ellas, contenía 20 g de harina. Los adultos de *T. evanescens* de los tratamientos Biológico, Biológico + AMs y Biológico + Presión, fueron retirados antes de poner los huevos del lepidóptero en las nuevas cajitas con la harina. A continuación, se procedía a hacer los tratamientos con CO₂ a alta presión y con AMs a presión atmosférica de las repeticiones correspondientes. La mezcla de gases inicial, preparada previamente con el mezclador de gases, en los tratamientos con AMs era: $93,13 \pm 1,48\%$ CO₂ / $2,53 \pm 0,27\%$ O₂ / $4,33 \pm 1,28\%$ N₂. Una vez realizados los tratamientos con CO₂, las cajitas se pusieron de nuevo en la cámara de condiciones ambientales controladas. A partir de la primera semana desde que se hicieron los tratamientos, y hasta la semana 14, se procedió a hacer el recuento de los adultos del lepidóptero en todos los tratamientos, y también del parasitoide en los tratamientos: Biológico, Biológico + AMs y Biológico + Presión (Figura 1.8).

Para la realización de los tratamientos con CO₂ a alta presión, se siguió la misma metodología que la descrita en el apartado 3.4 pero, el tiempo de tratamiento de las cajitas a 20 atm de presión, era de 15 min en vez de 60 min (Figura 1.8).

El procedimiento seguido en la realización de los tratamientos con AMs a presión atmosférica fue el mismo que el descrito en el apartado 3.4, a diferencia de que el tiempo de tratamiento era de 4 días en vez de 12 días (Figura 1.8).

Además, como medida del daño producido por la plaga, la última semana del recuento (semana 14) se pesaron las sedas y exuvios de mudas (residuos) producidas por las larvas del lepidóptero de cada una de las repeticiones.



Figura 1.7: Cajita utilizada en los tratamientos para el control de *E. kuehniella* y *P. interpunctella*.

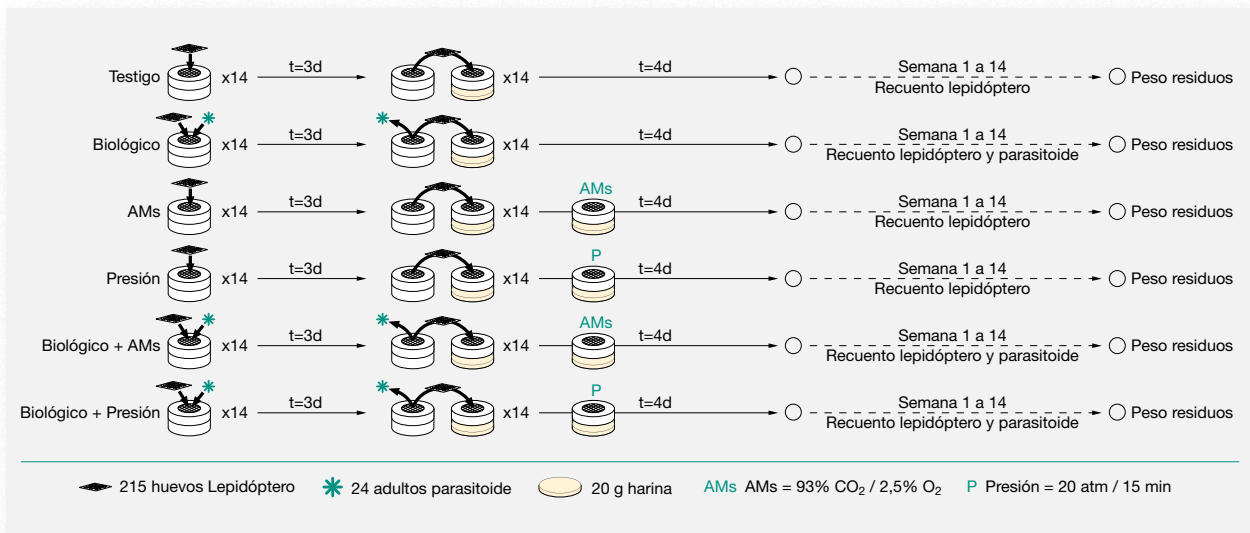


Figura 1.8: Esquema del procedimiento seguido en el ensayo de evaluación del efecto del control biológico y los tratamientos con CO_2 para el control de *E. kuehniella* o *P. interpunctella*.

3.6 Evaluación de la depredación de *Blattisocius tarsalis* sobre los huevos de *Ephestia kuehniella* y evaluación del control del depredador mediante el uso de gases

3.6.1 Evaluación del efecto del control biológico para el control de *Ephestia kuehniella*

Para llevar a cabo la evaluación de la depredación de huevos de *E. kuehniella* por parte del ácaro depredador *B. tarsalis*, se prepararon 7 proporciones de hembras del ácaro/huevos de *E. kuehniella*. Se utilizaron hembras del ácaro en lugar de machos, ya que la actividad depredadora de éstas es superior a la de los machos (Darst y King, 1969). Las proporciones depredador/plaga fueron: 0/20 (Testigo), 1/20, 2/20, 4/20, 10/20, 20/20 y 40/20, es decir, las proporciones depredador/plaga eran, respectivamente: 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1 y 2. De cada una de las proporciones se prepararon 10 repeticiones. Una repetición era una cajita aireada (descrita en el apartado 3.5)).

Para poder evaluar los daños producidos por la plaga, se simulaban las condiciones lo más parecidas posible a una superficie de una empresa o almacén de productos agroalimentarios con presencia de residuos, como por ejemplo, polvo de harina. Con la ayuda de un tamiz de 250μ de luz de malla, en cada cajita se ponía una fina capa de harina integral de trigo de cultivo ecológico (1,13 g) cubriendo toda la base, 20 huevos del lepidóptero de 0 a 3 días de edad y el número de hembras correspondientes de *B. tarsalis*, en función del tratamiento.

Las cajitas preparadas se ponían en la cámara climática dentro de una caja de condiciones ambientales constantes (70 x 46 x 16 cm) a 75% de HR y 25 °C de temperatura. Estas condiciones se conseguían poniendo en el interior de esta caja, un recipiente (30 x 22 x 10 cm) que contenía una solución de agua destilada con glicerina pura. La a_w de esta solución era, aproximadamente, 0,75. De esta manera, la HR en el interior de la caja, era del 75%. Para llevar a cabo el control de estas condiciones, se utilizó una sonda de temperatura y humedad relativa de la marca comercial TESTO Data logger 454 (Figura 1.9).

Pasados 4 días desde que las cajitas con los huevos del lepidóptero y las hembras adultas del ácaro depredador se pusieron dentro de la caja de condiciones ambientales controladas (4 días es el tiempo necesario para que una hembra adulta de *B. tarsalis* destruya, aproximadamente, 16 huevos de *E. kuehniella* (Nielsen, 1999)), se añadieron 20 g del mismo tipo de harina a las cajitas, para que las larvas supervivientes del lepidóptero se pudieran desarrollar. Las cajitas se volvieron a poner dentro de la caja de condiciones ambientales constantes, donde estarían 6 semanas, para asegurar que todas las larvas se habían desarrollado hasta el estadio de pupa.

Transcurridas estas semanas, de cada cajita y proporción (nº de hembras de *B. tarsalis*/huevos de *E. kuehniella*) estudiada, con la ayuda de un tamiz de 500 µ de luz de malla, se procedió a separar las sedas, las mudas y las pupas del lepidóptero de la harina. A continuación, se contaron el número de pupas, se pesaron las sedas, las mudas y las pupas conjuntamente (residuos), y se pesó la harina.



Figura 1.9: Sonda de temperatura y humedad relativa. Marca comercial TESTO Data logger 454.

3.6.2 Control de *Blattisocius tarsalis* con atmósferas modificadas a presión atmosférica y CO₂ a alta presión

Las condiciones a las que se hicieron los tratamientos con AMs a presión atmosférica fueron las que se muestran a continuación:

- Concentraciones de gases:
50,88 ± 0,48% CO₂ / 2,86 ± 0,1% O₂ / 46,26 ± 0,5% N₂
- Tiempo de tratamiento: de 1, 2 y 3 días

En cada tratamiento se prepararon 4 bolsas de envasado, cada una de las cuales contenía 5 cápsulas de gelatina. Como tratamiento testigo se prepararon 20 cápsulas de gelatina de 0,67 mL de volumen. En el interior de éstas había un huevo, una ninfa o un adulto del ácaro, y unos 15 huevos de *E. kuehniella*, en el caso de los ensayos con adultos y ninfas.

En los ensayos de huevos, se individualizaron huevos del ácaro en cada cápsula, y en los de adultos, en cada cápsula se puso un adulto del depredador y unos 15 huevos de *E. kuehniella* congelados, para asegurar que éstos se pudieran alimentar. En los ensayos de ninfas, se individualizaron huevos del ácaro con unos 15 huevos de *E. kuehniella*. Después de 24 h, se separaron las cápsulas en las que había eclosionado el huevo y que, por lo tanto, tenían la ninfa, y se volvieron a poner en la cámara de condiciones ambientales controladas durante 24 h más, para que la ninfa pasara al estadio de desarrollo de protoninfa.

Cuando las cápsulas estaban preparadas, se pusieron dentro de las bolsas impermeables a los gases (5 cápsulas/bolsa) y se procedió a hacer el envasado con la mezcla de gases anteriormente indicada. Esta mezcla se había preparado previamente con un mezclador de gases dentro de un pulmón. Después de hacer el envasado, las bolsas se pusieron dentro de la cámara climática. Allí se dejaron el tiempo necesario, dependiendo del tratamiento. Pasado este tiempo,

con el analizador de gases se midió la concentración de CO₂ y O₂ en el interior de cada bolsa, y a continuación, se abrieron las bolsas. Las cápsulas se volvieron a poner dentro de la cámara climática durante 24 h más.

Después de 24 h de haber puesto las cápsulas dentro de la cámara climática, en los ensayos de adultos y ninfas, utilizando la lupa binocular, se procedió a evaluar la mortalidad contando el número de individuos vivos y muertos. En los ensayos de huevos, pasadas 24 y 48 h, se procedió a evaluar la mortalidad contando el número de ninfas que habían emergido. Para cada estadio de desarrollo se determinó el tiempo mínimo de tratamiento necesario para obtener el 100% de mortalidad.

Los tratamientos de CO₂ a alta presión que se realizaron, fueron los que se indican a continuación:

- 20 atm de presión durante 30 s o 1 min (sólo para el estadio de desarrollo de huevo) y 5 o 10 min de exposición (para los estadios de desarrollo de ninfa y adulto).
- Testigo (no se aplicó tratamiento).

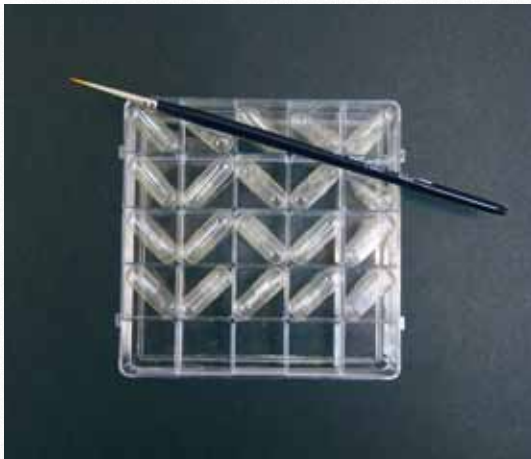


Figura 1.10: Caja de metacrilato en la cual se ponían las cápsulas de gelatina con individuos de *B. tarsalis*.

Para cada tratamiento se prepararon 20 cápsulas. En los ensayos de ninfas y adultos, en cada cápsula se puso un adulto o una ninfa del depredador y unos 15 huevos de *E. kuehniella* congelados. En los ensayos de huevos, se individualizaron huevos del ácaro en cada cápsula.

A continuación, las cápsulas se pusieron en cajas de metacrilato con 25 separaciones (20 cápsulas por caja) (Figura 1.10). Después, la caja con las 20 cápsulas se puso dentro de la cámara de alta presión, y se procedió a hacer el tratamiento, siguiendo la misma metodología que la descrita en el apartado 3.4, con la diferencia de que los tiempos

de tratamiento eran de 30 s, 1 min o 10 min, dependiendo del tratamiento. Cuando el tratamiento a presión finalizó, las cápsulas se pusieron dentro de la cámara climática durante 24 h.

El procedimiento seguido en el recuento de los resultados fue el mismo que en los tratamientos con AMs a presión atmosférica (explicado anteriormente en este mismo apartado).

3.7. Análisis de resultados

Los resultados obtenidos fueron tratados con el paquete estadístico JMP® 10.0.2 (SAS Institute, 2012).

En todos los ensayos, se comprobó la homogeneidad de las varianzas, mediante el test de Bartlett's. Los resultados que lo requerían se transformaban mediante el logaritmo (x+1) y si eran valores en porcentaje, con el arcoseno $\sqrt{(X/100)}$.

En los ensayos de evaluación del efecto del control biológico y los tratamientos con CO₂, para el control de los insectos *S. oryzae*, *E. kuehniella* y *P. interpunctella*, se calcularon las medias (\pm error estándar) de las concentraciones de CO₂ y O₂ del interior de las bolsas, al inicio y al final de los ensayos, de las repeticiones tratadas con AMs. Se comprobó si había diferencias significativas entre los resultados de cada gas para cada tratamiento, realizando un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía. Se calculó el número de adultos de la plaga y del parasitoide emergidos acumulados, a lo largo del estudio. Para cada plaga, la última semana del ensayo, se comprobó si existían diferencias significativas del número de adultos emergidos acumulados, entre los tratamientos Testigo y Biológico. Para ello, se realizó un ANOVA de una vía. En estos ensayos, también se calculó la media (\pm error estándar) del número total de adultos emergidos de cada plaga y de cada enemigo natural al final del ensayo, en todos los tratamientos realizados, y se determinó si había diferencias significativas entre los tratamientos, realizando un ANOVA de una vía.

En cuanto a la pérdida de peso del arroz (tratamientos con *S. oryzae*) al final del tiempo de tratamiento, se calculó la media (\pm error estándar) de los resultados obtenidos en cada tratamiento, y se realizó un ANOVA de una vía, para comprobar si existían diferencias significativas entre los tratamientos. En el caso del peso de los residuos (tratamientos con *E. kuehniella* y *P. interpunctella*) al final del ensayo, de los resultados obtenidos en cada tratamiento se calculó la media (\pm error estándar) y se realizó un ANOVA de una vía para comprobar si existían diferencias significativas entre los tratamientos. En los ensayos de depredación de huevos de *E. kuehniella*, por parte del ácaro *B. tarsalis*, se calcularon las medias (\pm error estándar), y para comprobar si existían diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó un ANOVA de una vía.

En el ensayo de control de *B. tarsalis* mediante tratamientos con CO₂ en AMs, se calcularon las medias (\pm error estándar) de las concentraciones de CO₂ y O₂ del interior de las bolsas, al inicio y al final de los ensayos, de las repeticiones tratadas con AMs. Se realizó un ANOVA de una vía, para comprobar si existían diferencias significativas entre los resultados de cada gas, para cada tratamiento. En todos los tratamientos se calcularon los porcentajes de mortalidad (media \pm error estándar) de los diferentes estadios de desarrollo del ácaro.

En todos los casos, si se detectaban diferencias, se realizaba un test de Tukey Multiple Range para comparar las medias.

4. Resultados

4.1 Evaluación del efecto del control biológico y tratamientos con CO₂ para el control de *Sitophilus oryzae*

En la Tabla 1.1 se muestran las medias de las concentraciones de CO₂ y O₂ en el interior de las bolsas del tratamiento AMs, y en la Tabla 1.2 las del tratamiento Biológico + AMs, al inicio y al

final de éstos. En ambos tratamientos, tanto la concentración de CO₂ como la de O₂ disminuyeron y aumentaron, respectivamente, de manera significativa, a lo largo de los 12 días del tiempo de tratamiento (Tablas 1.1 y 1.2). Concretamente, en el tratamiento con AMs, la concentración de CO₂ disminuyó significativamente un 13,9% ($F= 78,18$; g. l.= 1, 20; $P<0,001$) (Tabla 1.1) y en el tratamiento Biológico + AMs un 15,63%, respecto a la concentración inicial de este gas ($F= 106,23$; g. l.= 1, 20; $P<0,001$) (Tabla 1.2). La concentración de O₂ aumentó de manera significativa un 1,02% ($F= 27,14$; g. l.= 1, 20; $P<0,001$) y un 2,02% ($F= 22,85$; g. l.= 1, 20; $P<0,001$) en los tratamientos en AMs y Biológico + AMs, respectivamente (Tablas 1.1 y 1.2).

Tabla 1.1: Concentración de CO₂ (%) y O₂ (%) (media ± error estándar) en el interior de las bolsas que contenían las muestras del tratamiento AMs para el control de *S. oryzae*.

Día	Tratamiento	[CO ₂] (%)	[O ₂] (%)
0	Inicial	86,37 ± 1,64 a	2,49 ± 0,26 b
12	AMs	74,97 ± 0,33 b	3,51 ± 0,04 a

Las medias de cada columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre ellas ($P>0,05$, test Tukey, $n= 14$).

Tabla 1.2: Concentración de CO₂ (%) y O₂ (%) (media ± error estándar) en el interior de las bolsas que contenían las muestras del tratamiento Biológico + AMs para el control de *S. oryzae*.

Día	Tratamiento	[CO ₂] (%)	[O ₂] (%)
0	Inicial	86,37 ± 1,64 a	2,49 ± 0,26 b
12	Biológico + AMs	72,87 ± 0,33 b	4,51 ± 0,26 a

Las medias de cada columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre ellas ($P>0,05$, test Tukey, $n= 14$).

En la Figura 1.11, se representan las poblaciones acumuladas de *S. oryzae* en los tratamientos Testigo y Biológico y la de *L. distinguendus* del tratamiento Biológico a lo largo del ensayo.

Entre las semanas 4 y 7 del estudio se observó emergencia de adultos de *S. oryzae* en los dos tratamientos, y de *L. distinguendus* en el tratamiento Biológico (Figura 1.11). Concretamente, en la sexta semana fue cuando se produjo la máxima emergencia de adultos de los dos insectos. En la séptima semana la emergencia de los dos insectos disminuyó. En el tratamiento Biológico, las poblaciones de *S. oryzae* y *L. distinguendus* se mantuvieron prácticamente estables, de la semana 7 a la 10. En cambio, en el tratamiento Testigo, la población de *S. oryzae* se mantuvo constante de la semana 7 a la 9 y en la 10, se observó un aumento de la población acumulada, indicando el inicio de la emergencia de una segunda generación.

Al comparar los valores de las poblaciones acumuladas de *S. oryzae* al final del ensayo (semana 10), se observaron diferencias significativas ($F= 81,92$; g. l.= 1, 32; $P<0,001$). Al final del ensayo, la presencia del parasitoide, en el tratamiento Biológico, hizo disminuir la población acumulada de *S. oryzae* un 93,57%.

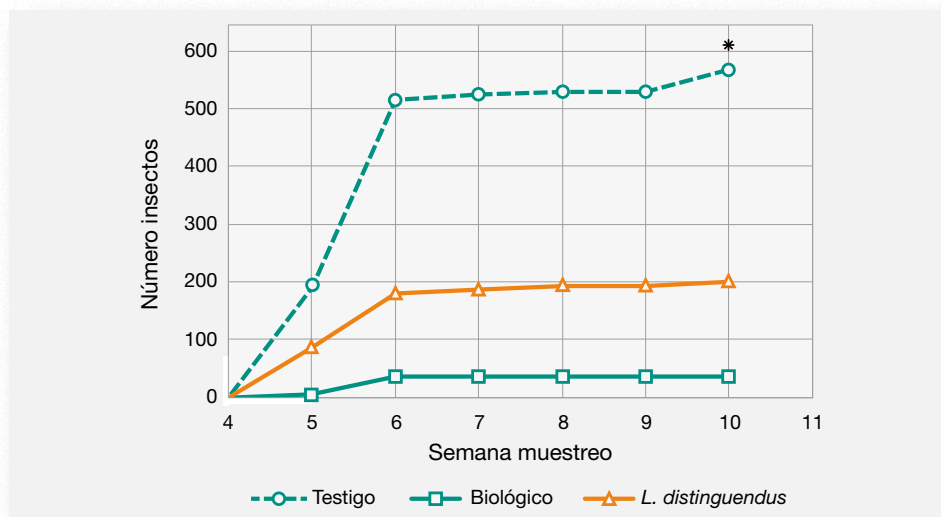


Figura 1.11: Número de adultos emergidos acumulados semanalmente de *S. oryzae*, en los tratamientos Testigo y Biológico, y de *L. distinguendus* en el tratamiento Biológico. El asterisco indica diferencias significativas entre las poblaciones acumuladas de *S. oryzae* de los tratamientos Testigo y Biológico en la semana 10 ($P < 0,05$, test Tukey $n = 14$).

En la Figura 1.12 se representa la media del número total de insectos (*S. oryzae* y *L. distinguendus*) obtenidos en cada tratamiento al final del ensayo.

Se observó una reducción significativa del número total de los insectos emergidos (*S. oryzae* y *L. distinguendus*) en todos los tratamientos, con respecto al Testigo ($F = 843,84$; g. l. = 5, 88; $P < 0,001$) (Figura 1.12). La presencia de *L. distinguendus*, en el tratamiento Biológico, hizo disminuir el número de *S. oryzae* y, también, el número total de insectos de manera significativa, con respecto al Testigo. Como consecuencia, el total del número de insectos (plaga y parasitoide) se redujo un 58,1% con respecto al Testigo. La aplicación del tratamiento AMs redujo significativamente el número de *S. oryzae*, con respecto al Testigo, en un 94,2%. En los demás tratamientos en los que se aplicaron tratamientos con CO_2 (Presión, Biológico + AMs y Biológico + Presión), no emergió ningún insecto.

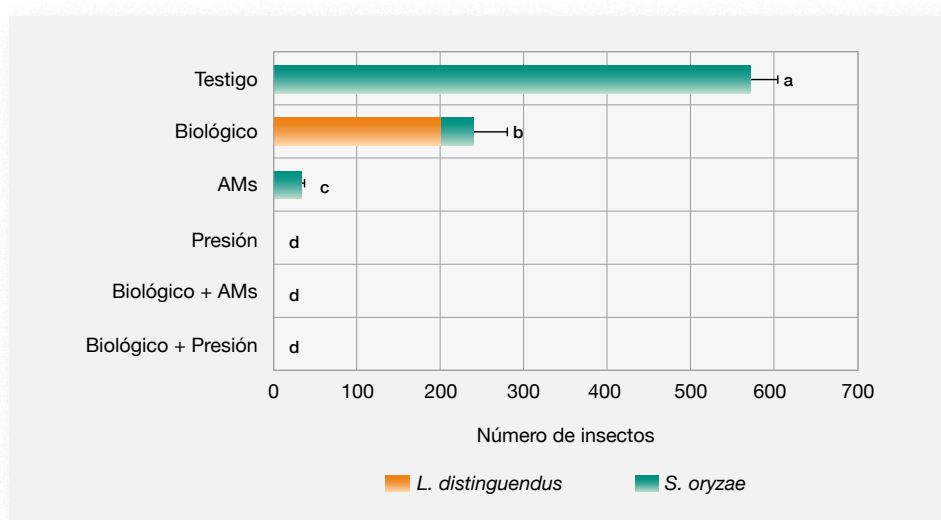


Figura 1.12: Recuento total de adultos emergidos de *L. distinguendus* y *S. oryzae* (media ± error estándar) durante un período de 10 semanas. Las medias con una misma letra no son significativamente diferentes entre ellas ($P > 0,05$, test Tukey, $n = 14$).

En la Figura 1.13, se muestra la pérdida de peso del arroz al final del ensayo en todos los tratamientos.

Tanto la presencia de parasitoides, como los tratamientos con CO₂ y los tratamientos Biológico + AMs o Biológico + Presión, hicieron disminuir significativamente la pérdida de peso, con respecto al Testigo ($F= 165,6$; g. l.= 5, 74; $P<0,001$) (Figura 1.13).

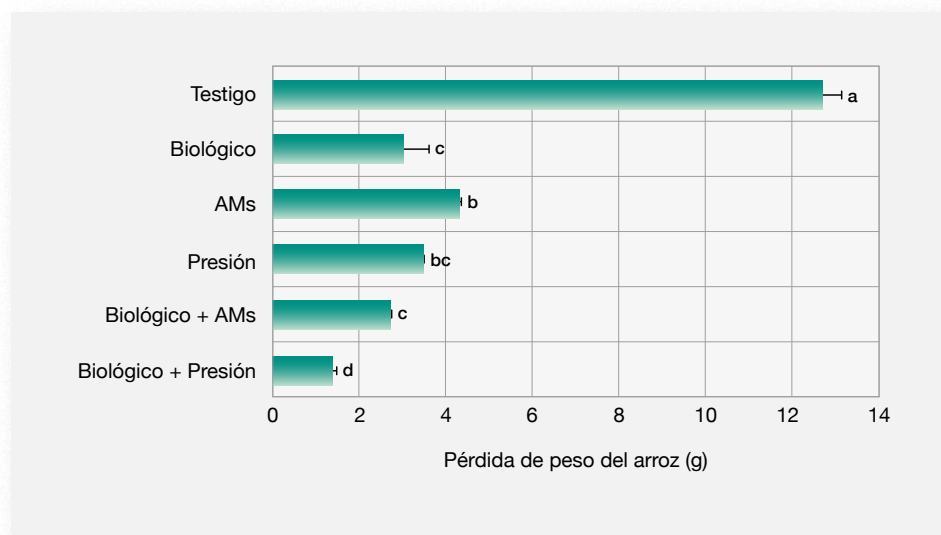


Figura 1.13: Pérdida de peso (media±error estándar) del arroz al cabo de 10 semanas de almacenamiento, producida por la presencia de *S. oryzae* en las muestras de todos los tratamientos estudiados. Las medias con una misma letra no son significativamente diferentes entre ellas ($P>0,05$, test Tukey, $n=14$).

Al comparar el tratamiento Biológico con el Testigo, se observó que en este último hubo una pérdida de peso producida por la plaga de alrededor de un 15%, mientras que en el tratamiento Biológico esta pérdida fue de un 4%, aproximadamente. Esta reducción fue muy similar a la producida por el tratamiento de CO₂ a presión. Entre estos dos tratamientos no se observaron diferencias significativas. En el tratamiento Presión, la pérdida de peso fue ligeramente superior a 3 g pero, cuando este tratamiento se combinó con la presencia del parasitoide, la pérdida de peso se redujo en más de la mitad, concretamente a 1,36 g. En el caso del tratamiento Biológico + AMs, la pérdida de peso se redujo alrededor de un 37%, con respecto al tratamiento AMs.

4.2 Evaluación del efecto del control biológico mediante el parasitoide *Trichogramma evanescens* y los tratamientos con CO₂, para el control de *Ephestia kuehniella* y *Plodia interpunctella*

Los resultados obtenidos de las concentraciones de CO₂ y O₂ en el interior de las bolsas al inicio y al final de los tratamientos AMs y Biológico + AMs con *E. kuehniella*, se muestran en las Tablas 1.3 y 1.4.

Tanto en el tratamiento con AMs como en el Biológico + AMs, los dos gases variaron significativamente a lo largo de los 4 días del tiempo de tratamiento. En el tratamiento con AMs la concentración de CO₂ disminuyó un 11,17% ($F= 33,50$; g. l.= 1, 16; $P<0,001$) (Tabla 1.3) y en el Biológico + AMs un 7,4% ($F= 8,12$; g. l.= 1, 16; $P<0,001$) (Tabla 1.4), respecto a la concentración

inicial de este gas. La concentración de O₂, en el tratamiento en AMs, aumentó un 2,48% ($F= 55,91$; g. l.= 1, 16; $P<0,001$) y en el Biológico + AMs menos de un 2% ($F= 17,33$; g. l.= 1, 16; $P<0,001$) (Tablas 1.3 y 1.4).

Tabla 1.3: Concentración de CO₂ (%) y O₂ (%) (media ± error estándar) en el interior de las bolsas que contenían las muestras del tratamiento AMs para el control de *E. kuehniella*.

Día	Tratamiento	[CO ₂] (%)	[O ₂] (%)
0	Inicial	93,13 ± 1,48 a	2,53 ± 0,27 b
4	AMs	82,72 ± 0,76 b	5,01 ± 0,14 a

Las medias de cada columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre ellas ($P>0,05$, test Tukey, $n= 14$).

Tabla 1.4: Concentración de CO₂ (%) y O₂ (%) (media ± error estándar) en el interior de las bolsas que contenían las muestras del tratamiento Biológico + AMs para el control de *E. kuehniella*.

Día	Tratamiento	[CO ₂] (%)	[O ₂] (%)
0	Inicial	93,13 ± 1,48 a	2,53 ± 0,27 b
4	Biológico + AMs	86,23 ± 1,06 b	4,48 ± 0,20 a

Las medias de cada columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre ellas ($P>0,05$ test Tukey, $n= 14$).

En las Tablas 1.5 y 1.6, se muestran los resultados obtenidos de las concentraciones de CO₂ y O₂ en el interior de las bolsas al inicio y al final de los tratamientos AMs y Biológico + AMs con *P. interpunctella*.

En los dos tratamientos, tanto el CO₂ como el O₂ variaron significativamente a lo largo de los 4 días del tiempo de tratamiento. En el tratamiento con AMs la concentración de CO₂ disminuyó un 7,61% ($F= 6,33$; g. l.= 1, 16; $P<0,05$) (Tabla 1.5) y en el Biológico + AMs un 6,78% ($F= 12,65$; g. l.= 1, 16; $P<0,01$) (Tabla 1.6). En cuanto a la concentración de O₂, en el tratamiento con AMs, la concentración de este gas aumentó un 2,11% ($F= 25,43$; g. l.= 1, 16; $P<0,001$) y en el Biológico + AMs el mismo porcentaje que en el tratamiento con AMs ($F= 47,92$; g. l.= 1, 16; $P<0,001$) (Tablas 1.5 y 1.6).

Tabla 1.5: Concentración de CO₂ (%) y O₂ (%) (media ± error estándar) en el interior de las bolsas que contenían las muestras del tratamiento AMs para el control de *P. interpunctella*.

Día	Tratamiento	[CO ₂] (%)	[O ₂] (%)
0	Inicial	93,13 ± 1,48 a	2,53 ± 0,27 b
4	AMs	82,04 ± 0,76 b	4,64 ± 0,18 a

Las medias de cada columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre ellas ($P>0,05$, test Tukey, $n= 14$).

Tabla 1.6: Concentración de CO₂ (%) y O₂ (%) (media ± error estándar) en el interior de las bolsas que contenían las muestras del tratamiento Biológico + AMs para el control de *P. interpunctella*.

Día	Tratamiento	[CO ₂] (%)	[O ₂] (%)
0	Inicial	93,13 ± 1,48 a	2,53 ± 0,27 b
4	Biológico + AMs	86,81 ± 1,06 b	4,64 ± 0,12 a

Las medias de cada columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre ellas ($P > 0,05$, test Tukey, $n = 14$).

En la Figura 1.14 se muestran los resultados de la población acumulada de *E. kuehniella*, en los tratamientos Testigo y Biológico, y de *T. evanescens* en el tratamiento Biológico.

Tanto en el tratamiento Testigo como en el Biológico, emergieron adultos de *E. kuehniella* a partir de la semana 8 hasta la semana 14 (Figura 1.14). La máxima emergencia de adultos de *E. kuehniella*, en los dos tratamientos, se produjo en la semana 10 del ensayo. A partir de la semana 10 y hasta el final del ensayo (semana 14) la emergencia de los adultos del lepidóptero fue disminuyendo progresivamente hasta llegar a un valor de, prácticamente, 0 al final del ensayo. En cuanto al parasitoide, se observó emergencia de adultos la primera y la segunda semana después de poner en contacto los huevos de *E. kuehniella* con los adultos del parasitoide. La media del número de parasitoides la primera semana fue de unos 104 adultos, mientras que la tercera semana fue de 0,64 adultos. Después de la tercera semana no se observó una segunda generación de parasitoide.

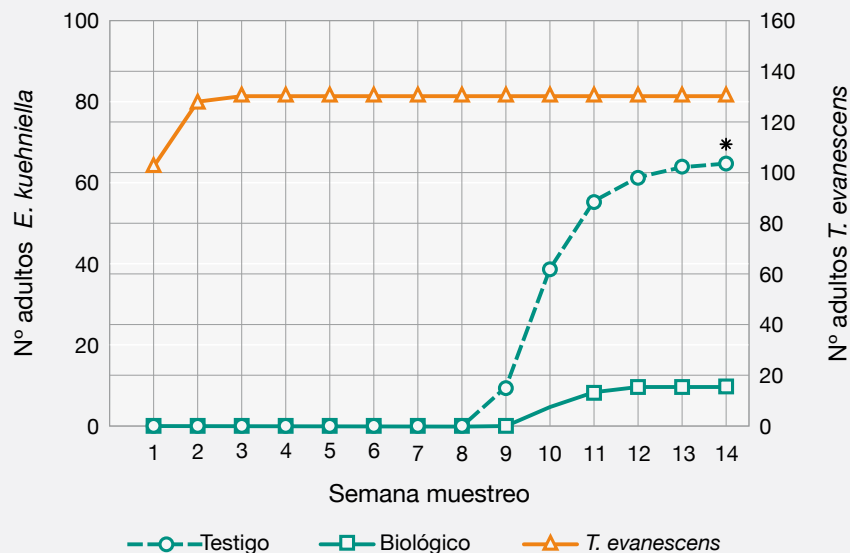


Figura 1.14: Número de adultos emergidos acumulados de *E. kuehniella* de la semana 1 a la 14 del ensayo, en los tratamientos Testigo y Biológico y, de adultos emergidos acumulados de *T. evanescens*, en el tratamiento Biológico. El asterisco indica diferencias significativas entre los valores de adultos emergidos acumulados de *E. kuehniella* de los tratamientos Testigo y Biológico ($P < 0,05$, test Tukey, $n = 14$).

Al final del ensayo se observaron diferencias significativas del número de adultos emergidos acumulados de *E. kuehniella*, entre los tratamientos Testigo y Biológico ($F= 29,67$; g. l. = 1, 27; $P<0,001$). La presencia del enemigo natural hizo reducir la población de *E. kuehniella* significativamente en el tratamiento Biológico.

En la Figura 1.15 se muestran los resultados obtenidos del número total de insectos (*E. kuehniella* y *T. evanescens*) al final del ensayo.

Se observaron diferencias significativas entre el tratamiento Testigo y el resto de tratamientos, así como entre el tratamiento Biológico y los demás tratamientos ($F= 3343,45$; g. l.= 5, 83; $P<0,001$) (Figura 1.15). En los tratamientos con CO_2 y en los de CO_2 con el Biológico con los de CO_2 , se observó un 100% de mortalidad de los insectos. En el tratamiento Biológico, se observó una reducción del número de adultos de *E. kuehniella* emergidos con respecto al tratamiento Testigo. Concretamente, esta reducción fue de un 74,5%. Sin embargo, el elevado número de parasitoides hizo aumentar significativamente el número total de insectos, con respecto al Testigo ($F= 3343,45$; g. l.= 5, 83; $P<0,001$). Entre el tratamiento Biológico y los tratamientos: AMs, Presión, Biológico + AMs y Biológico + Presión, también hubo una reducción significativa del número total de insectos. Es estos tratamientos no emergió ningún insecto, ni de la plaga ni del parasitoide.

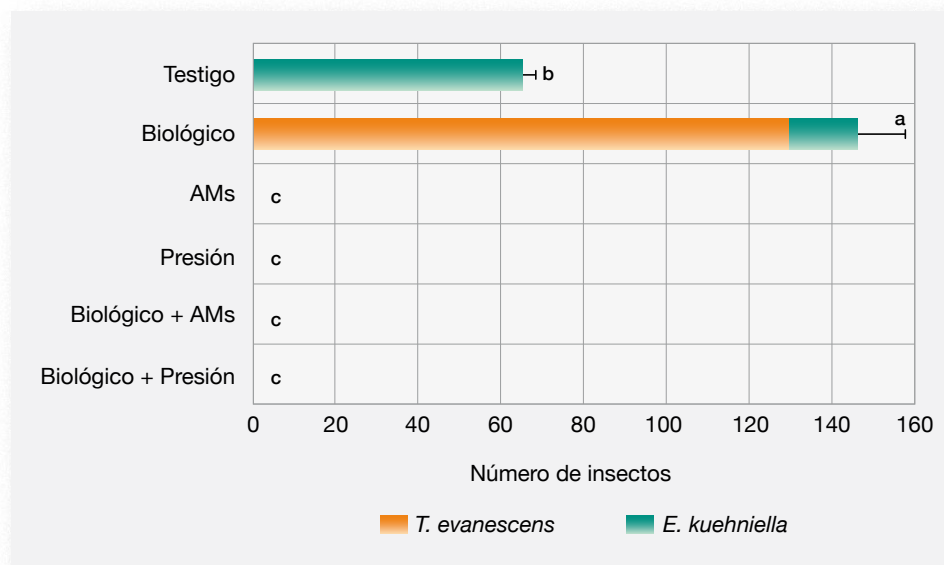


Figura 1.15: Recuento total de adultos emergidos de *T. evanescens* y *E. kuehniella* (media \pm error estándar) durante un periodo de 14 semanas. Las medias con una misma letra no son significativamente diferentes entre ellas ($P>0,05$, test Tukey, $n=14$).

En la Figura 1.16 se muestran los resultados obtenidos del peso de los residuos producidos por *E. kuehniella* a lo largo del ensayo, en cada uno de los tratamientos.

Los resultados obtenidos indicaron una disminución significativa de los residuos producidos en el tratamiento Biológico, con respecto al Testigo ($F= 61,64$; g. l.= 5, 83; $P<0,001$) (Figura 1.16). Concretamente, el parasitoide produjo una reducción del peso de los residuos de alrededor de

un 56%. En los tratamientos con CO₂ y Biológico no hubo producción de residuos, ya que en ellos no hubo presencia de insectos (Figura 1.16).

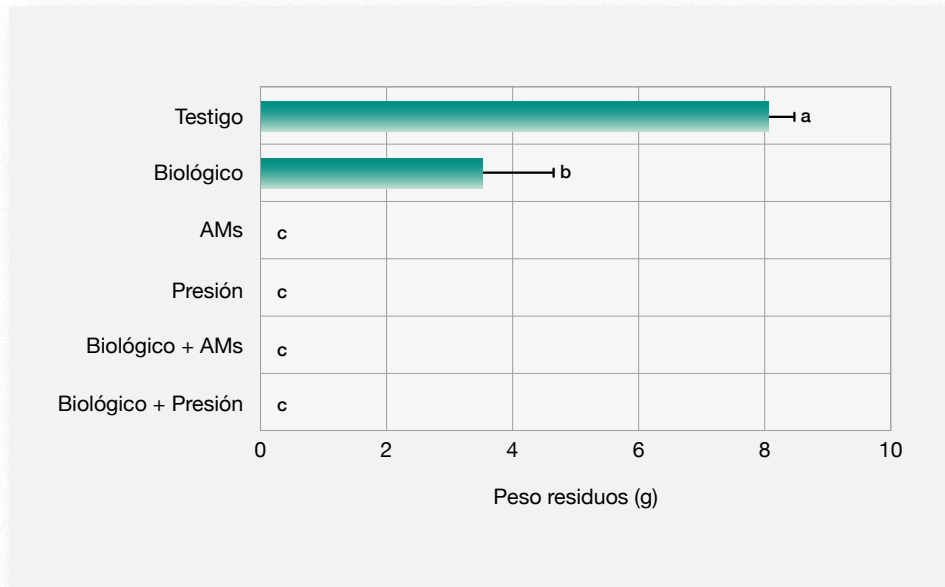


Figura 1.16: Peso (g) de los residuos producidos por *E. kuehniella* (media±error estándar) al cabo de 14 semanas de almacenamiento, en las muestras de todos los tratamientos estudiados. Las medias con una misma letra no son significativamente diferentes entre ellas ($P>0,05$, test Tukey, $n=14$).

En la siguiente Figura (1.17) se muestran los resultados de los adultos emergidos acumulados de *P. interpunctella* en los tratamientos Testigo y Biológico, y de *T. evanescens* en el tratamiento Biológico.

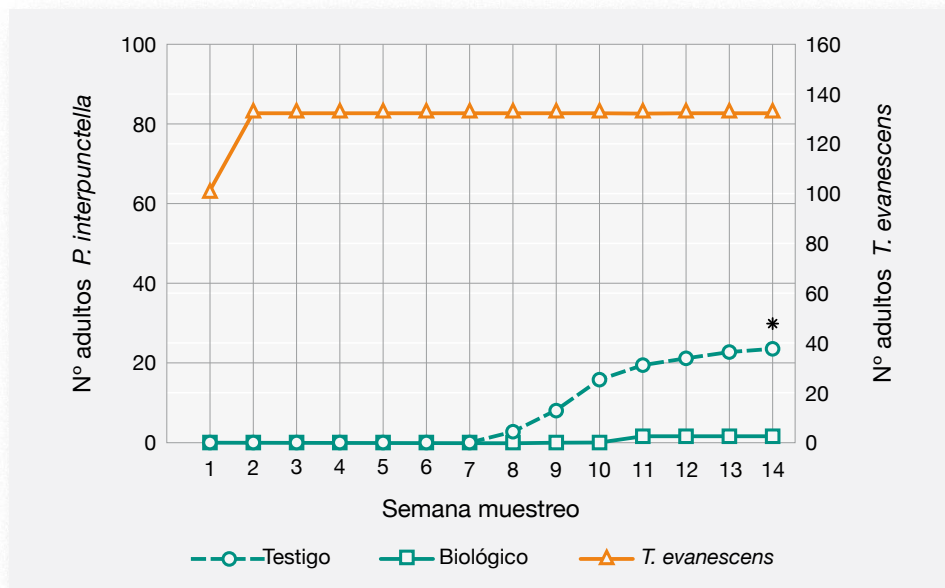


Figura 1.17: Número de adultos emergidos acumulados desde la semana 1 a la 14 de *P. interpunctella*, en los tratamientos Testigo y Biológico, y de *T. evanescens*, en el tratamiento Biológico. El asterisco indica diferencias significativas entre los valores del número de adultos de *P. interpunctella* emergidos de los tratamientos Testigo y Biológico ($P<0,05$, test Tukey, $n=14$).

Entre la semana 5, en el tratamiento Biológico, o la semana 6, en el tratamiento Testigo y la semana 14 del ensayo, emergieron adultos de *P. interpunctella* (Figura 1.17). Concretamente, fue en la semana 10 del ensayo cuando se produjo la máxima emergencia de adultos de *P. interpunctella* tanto en el tratamiento Testigo como en el tratamiento Biológico. A partir de la semana 10 y hasta el final del ensayo, esta emergencia fue disminuyendo progresivamente en los dos tratamientos. En cuanto al parasitoide, la primera semana del recuento se observó el mayor número de adultos, pero a partir de esta semana y hasta la tercera, la emergencia de *T. evanescens* disminuyó progresivamente hasta llegar a un valor prácticamente nulo. A partir de la semana 4 y hasta el final del ensayo no se detectaron adultos del parasitoide.

La última semana de recuento, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos Testigo y Biológico ($F= 100,85$; g. l.= 1, 27; $P<0,001$). La presencia del enemigo natural hizo disminuir significativamente la población del lepidóptero en el tratamiento Biológico.

A continuación, en la Figura 1.18 se muestran los resultados del número total de insectos (*P. interpunctella* y *T. evanescens*) obtenidos en cada tratamiento al final del ensayo.

Se observaron diferencias significativas entre el Testigo y el resto de tratamientos ($F= 844,58$; g. l.= 5, 83; $P<0,001$) (Figura 1.18). En el tratamiento Biológico, la presencia de *T. evanescens* hizo disminuir significativamente el número de adultos de *P. interpunctella* de un valor promedio de 23,4 a un valor de 2,2. Sin embargo, el número de *T. evanescens* presentes en el tratamiento Biológico hizo aumentar el número total de insectos a un promedio de 136,5.

En los tratamientos con CO₂ a presión y con AMs, así como en los tratamientos en los que se combinaba el tratamiento Biológico con los tratamientos con CO₂, hubo un control total del lepidóptero y los parasitoides no sobrevivieron.

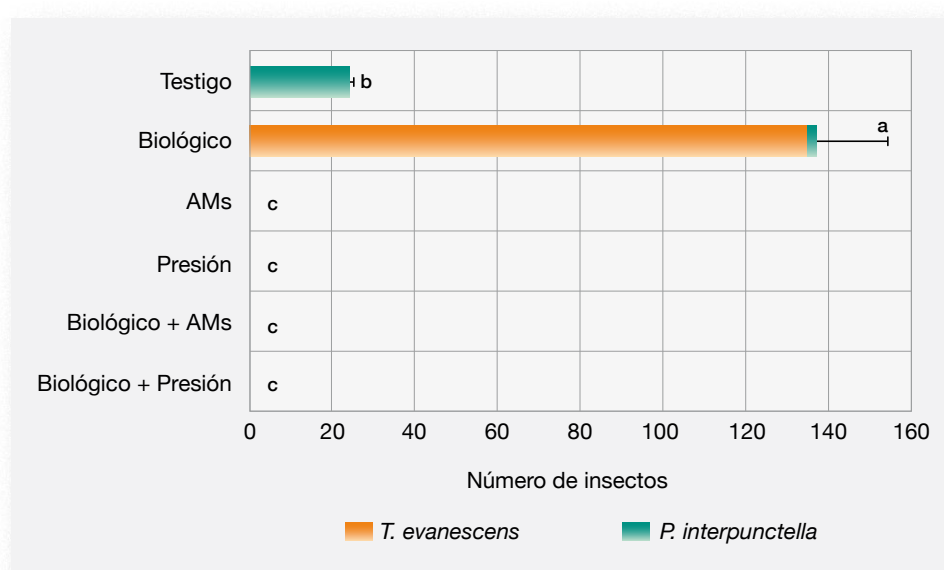


Figura 1.18: Recuento total de adultos emergidos *T. evanescens* y *P. interpunctella* (media ± error estándar) durante un periodo de 14 semanas. Las medias con una misma letra indican que los valores del número total de insectos no son significativamente diferentes entre ellos ($P>0,05$, test Tukey, $n= 14$).

El peso total de los residuos obtenidos al final del ensayo y en cada uno de los tratamientos se representa en la Figura 1.19.

Todos los tratamientos redujeron significativamente la producción de residuos con respecto al Testigo ($F= 295,83$; g. l.= 5, 83; $P<0,001$) (Figura 1.19). Entre los tratamientos AMs, Presión, Biológico + AMs y Biológico + Presión, no se observaron diferencias significativas. En el tratamiento Biológico se produjo un 92,7% menos de residuos que en el Testigo. En los tratamientos: AMs, Biológico + AMs y Biológico + Presión, no hubo presencia de residuos.

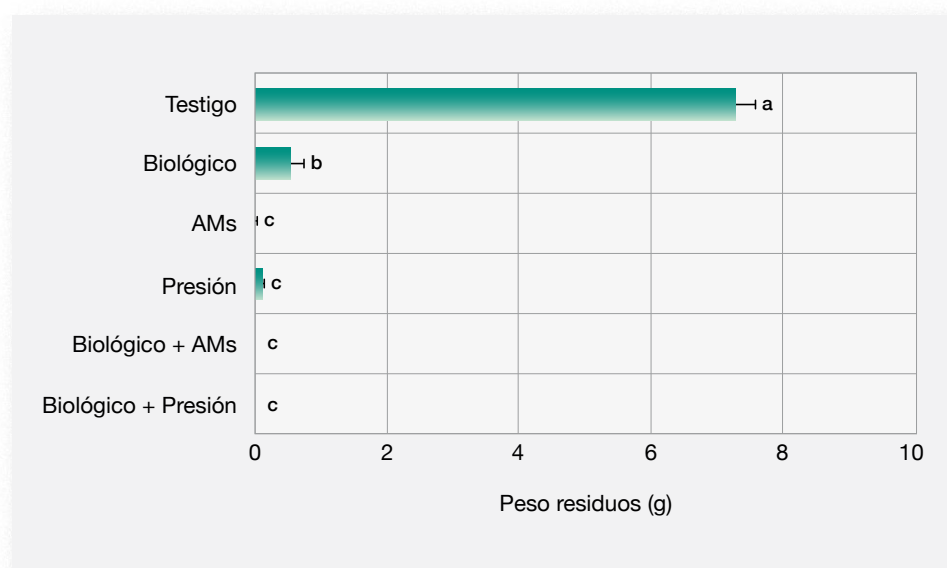


Figura 1.19: Peso (g) de los residuos producidos por *P. interpunctella* (media±error estándar) al cabo de 14 semanas de almacenamiento, en las muestras de todos los tratamientos estudiados. Las medias con una misma letra no son significativamente diferentes entre ellas ($P>0,05$, test Tukey, $n= 14$).

4.3 Evaluación de la depredación de *Blattisocius tarsalis* sobre huevos de *Ephestia kuehniella* y evaluación del control del depredador mediante el uso de gases

4.3.1 Evaluación del efecto del control biológico sobre *Ephestia kuehniella*, producción de residuos y pérdida de peso de la harina

En la Figura 1.20 se muestran las medias del número de pupas de *E. kuehniella* obtenidas a partir de 20 huevos del lepidóptero, los cuales se pusieron inicialmente en contacto con la harina en cada repetición, en función de la proporción de adultos de *B. tarsalis*/huevos de *E. kuehniella* (0 (Testigo), 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1 y 2).

Se observó una disminución significativa del número de pupas del lepidóptero a medida que aumentaba el número de depredadores ($F=18,04$; g.l.= 6, 69; $P<0,001$). No se observaron diferencias significativas entre las proporciones 0,2, 0,5, 1 y 2, pero sí entre éstas y el testigo. La proporción mínima a la que se observó que el control biológico empezaba a reducir las poblaciones era de 0,1. La reducción del número de pupas obtenidas en la proporción 0,1 respecto al testigo fue de 20,11%.

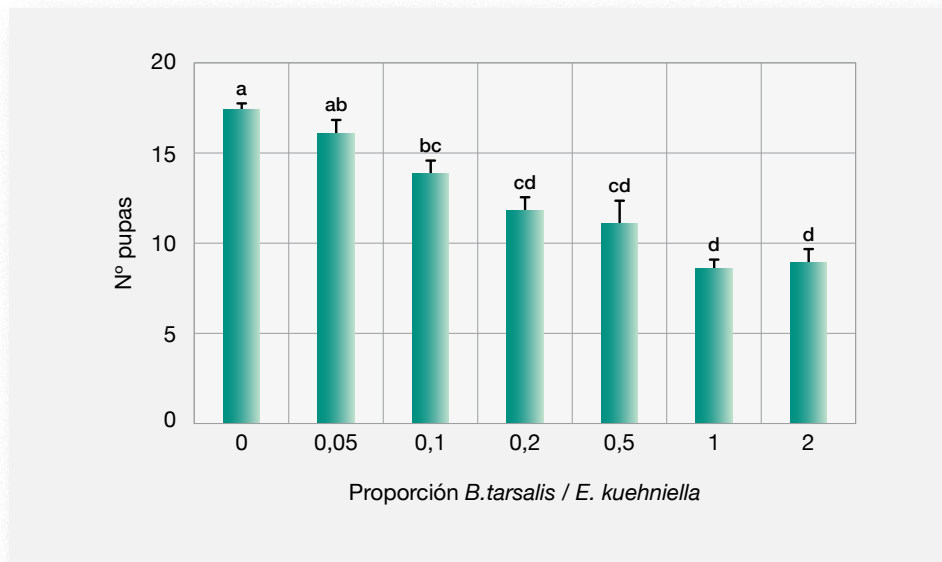


Figura 1.20: Número de pupas de *E. kuehniella* (media ± error estándar) obtenidas en las diferentes proporciones de adultos *B. tarsalis*/huevos *E. kuehniella*, que se pusieron inicialmente en cada repetición. El número de huevos de *E. kuehniella* por repetición era de 20. Las medias con una misma letra no son significativamente diferentes entre ellas ($P > 0,05$, test Tukey, $n = 5$).

Los resultados obtenidos del peso de residuos producidos por las larvas de *E. kuehniella*, en función de la proporción de adultos de *B. tarsalis*/huevos de *E. kuehniella* que se pusieron en contacto inicialmente en cada cajita, son los que se muestran en la Figura 1.21.

A partir de la proporción 0,1 se notó una reducción significativa del peso de residuos producido por parte del lepidóptero, con respecto al testigo ($F = 17,33$; g.l. = 6, 69; $P < 0,001$). Concretamente, la reducción fue de un 21,6%. En la proporción 2 se produjo una reducción del 47,5% con respecto al testigo.

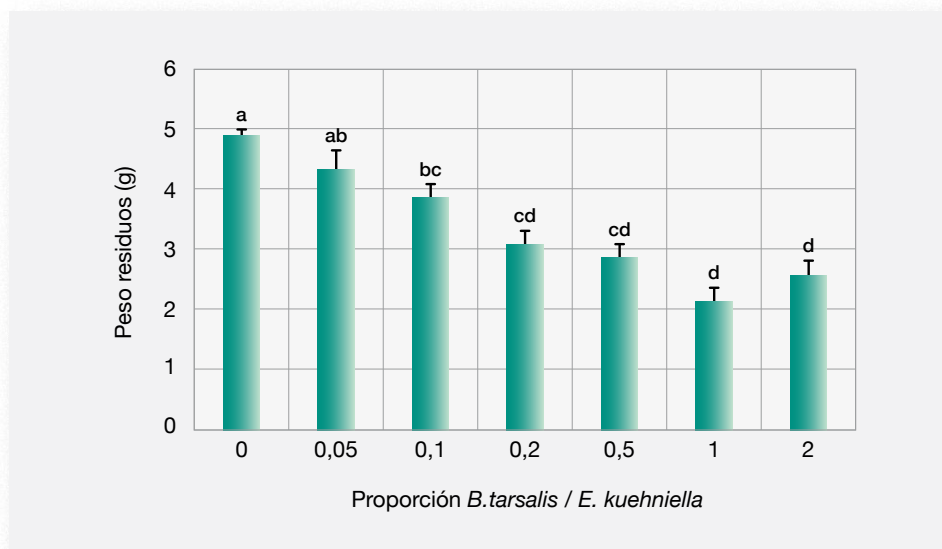


Figura 1.21: peso de los residuos (sedas, mudas y pupas) (media ± error estándar) de *E. kuehniella* obtenidos de las distintas proporciones de adultos de *B. tarsalis*/huevos de *E. kuehniella*, que se pusieron inicialmente en cada cajita. El número de huevos de *E. kuehniella* por repetición era de 20. Las medias representadas con una misma letra no son significativamente diferentes entre ellas ($P > 0,05$, test Tukey, $n = 5$).

En la Figura 1.22, se representa la media del peso de la harina al final del tratamiento, en función de la proporción de adultos *B. tarsalis*/huevos de *E. kuehniella*.

Los resultados mostraron que entre el testigo y la proporción 0,05 no había diferencias significativas, pero sí entre el testigo y las demás proporciones ($F=20,53$; g.l. =6, 69; $P<0,001$). El peso de la harina en la proporción 2 al final del tratamiento fue de 17,6, es decir, las 8,9 larvas que se desarrollaron hasta el estadio de pupa, consumieron 2,3 g de harina. En cambio, las 17,4 larvas del testigo consumieron 5,5 g de harina. Por lo tanto, la disminución del consumo de harina en la proporción 2 respecto al testigo fue de 41,9% (Figura 1.22).

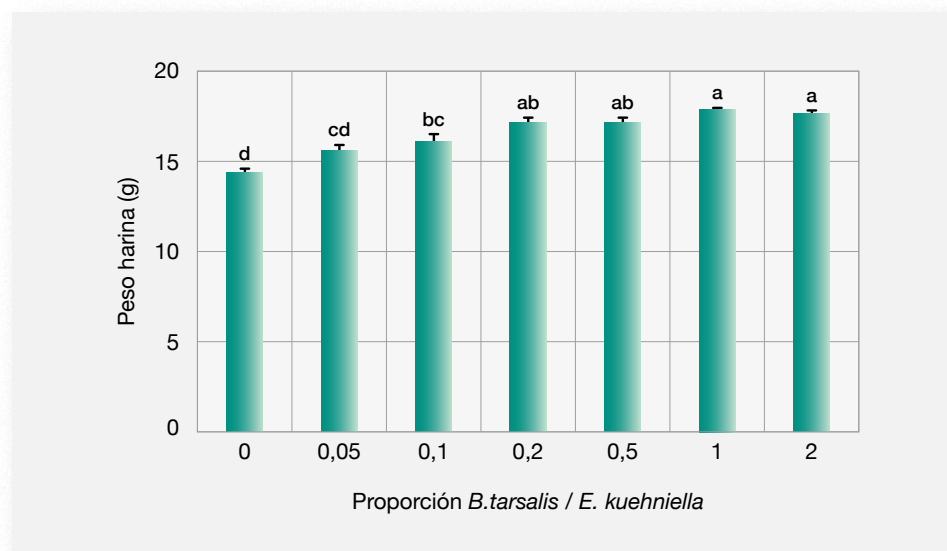


Figura 1.22: Peso de la harina al final del tratamiento (media \pm error estándar) en relación a la proporción de adultos de *B.tarsalis*/huevos de *E. kuehniella*, que se pusieron inicialmente en cada cajita. El peso inicial de la harina era de 20 g. El número de huevos de *E. kuehniella* por repetición era de 20. Las medias representadas con una misma letra no son significativamente diferentes entre ellas ($P>0,05$, test Tukey, $n=5$).

4.3.2 Control de *Blattisocius tarsalis* con atmósferas modificadas a presión atmosférica y CO_2 a alta presión

En la Tabla 1.7 se muestran los resultados obtenidos de las concentraciones de CO_2 y O_2 en el interior de las bolsas, al inicio y al final de cada tratamiento (1, 2 o 3 días) con AMs a presión atmosférica, para el control de *B. tarsalis*.

En el tratamiento a 1 día, la concentración de CO_2 disminuyó significativamente un 1,5%, con respecto a la concentración inicial de CO_2 ($F=5,74$; g. l.= 3, 33; $P<0,01$) (Tabla 1.7). En los tratamientos a 2 y 3 días, la concentración de este gas se mantuvo estadísticamente igual que al inicio del ensayo. En referencia a la concentración de O_2 , no se observaron diferencias significativas de las concentraciones de este gas a 1, 2 o 3 días, con respecto al valor inicial (Tabla 1.7).

Los resultados de la mortalidad de huevos, ninfas y adultos de *B. tarsalis* en los tratamientos a 1, 2 y 3 días, con AMs a presión atmosférica, son los que se muestran en la Tabla 1.8.

Con los resultados obtenidos, se observó que para conseguir el 100% de mortalidad de los estadios de desarrollo de ninfas y adultos, se necesitaron 2 días de exposición a esta AM, mientras que para el estadio de huevo se necesitó un día más.

En los tratamientos con CO₂ a alta presión, los resultados mostraron que para conseguir el 100% de mortalidad de los estadios de desarrollo de ninfa y adulto, se necesitó un tiempo mínimo de 10 min (Tabla 1.9). En cambio, el estadio de huevo se mostró más sensible al tratamiento. Con un 1 min de tratamiento, ya no hubo supervivencia.

Tabla 1.7: Concentración de CO₂ (%) y O₂ (%) (media ± error estándar) en el interior de las bolsas que contenían las muestras de los tratamientos con AMs para el control de *B. tarsalis*.

Día	[CO ₂] (%)	[O ₂] (%)
0	50,88 ± 0,48 a	2,86 ± 0,10
1	49,37 ± 0,26 b	3,22 ± 0,19
2	50,28 ± 0,23 a	3,10 ± 0,14
3	51,95 ± 0,53 a	2,55 ± 0,17

Las medias de cada columna seguidas de la misma letra o sin letra, no son significativamente diferentes entre ellas ($P > 0,05$, test Tukey, $n = 4$).

Tabla 1.8: Porcentaje de mortalidad de los diferentes estadios de desarrollo (huevos, ninfas y adultos) de *B. tarsalis*, sometidos a tratamientos en atmósferas modificadas ricas en CO₂ ($n = 20$).

Estadio desarrollo	Tiempo tratamiento (días)	Mortalidad (%) (media ± error estándar)
Huevo	3	100
	2	55 ± 5,50
Ninfa	2	100
	1	70 ± 17,30
Adulto	2	100
	1	95 ± 5,00

Tabla 1.9: Porcentaje de mortalidad de los diferentes estadios de desarrollo (huevos, ninfas y adultos) de *B. tarsalis*, en los tratamientos con CO₂ a 20 atm de presión ($n = 20$).

Estadio desarrollo	Tiempo tratamiento	Mortalidad (%) (media ± error estándar)
Huevo	1'	100
	30''	60 ± 11,20
Ninfa	10'	100
	5'	80 ± 9,20
Adulto	10'	100
	5'	80 ± 9,20

5. Discusión

5.1 Evaluación del efecto del control biológico y los tratamientos con CO₂ para el control de *Sitophilus oryzae*

La disminución de la concentración de CO₂ en el interior de las bolsas de los tratamientos AMs y Biológico + AMs para el control de *S. oryzae*, a lo largo del tiempo de tratamiento, se atribuye a la disolución de este gas en las grasas y humedad del arroz, y en los insectos (Tablas 1.1 y 1.2). El incremento de la concentración de O₂ al final de los tratamientos podría atribuirse a la liberación del O₂, que hubiera podido estar entre los granos de arroz o partículas de harina, desde el inicio de los tratamientos (Tablas 1.1 y 1.2). Sin embargo, este incremento no se considera relevante ya que este aumento fue de menos de un 2,5% y a nivel industrial niveles de O₂ de entre un 3% y un 5% en el interior de los envases o recipientes se consideran aceptables.

El incremento del número acumulado de *L. distinguendus* entre las semanas 4 y 6 indicó que la emergencia de los parasitoides se inició a partir de la semana 4, siendo la máxima emergencia en la semana 6 (Figura 1.11). Los primeros parasitoides se observaron cuando habían pasado unos 20 días, aproximadamente, desde que los adultos de éste se pusieron en contacto con el arroz en el cual había estados inmaduros de *S. oryzae*. Este número de días son los que necesita el parasitoide para desarrollarse hasta el estado de adulto a 25 °C (Ryoo *et al.*, 1991). Se observó una reducción significativa del número de coleópteros acumulados la última semana del ensayo, entre los tratamientos Testigo y Biológico, lo cual indicó que la presencia del parasitoide a lo largo de este periodo de tiempo fue capaz de reducir la población de la plaga en un 93,6%. A partir de la semana 9 se observó que el número de *S. oryzae* incrementaba, ya que empezaba a emerger una segunda generación de la plaga en el tratamiento Testigo. Posiblemente, entre las semanas 10 y 11 del ensayo, una segunda generación del parasitoide emergería, ya que habrían pasado unos 20 días desde la semana 6, que sería en la que las hembras de los parasitoides habrían iniciado la puesta de los huevos. La longevidad de las hembras de *L. distinguendus* es de unos 15 días, a 25 °C (Bellows, 1985). Esto indica que, prácticamente, cuando las hembras mueren, está emergiendo una nueva generación de parasitoides. De esta manera, una vez se hubieran liberado los parasitoides, y las condiciones ambientales fueran favorables, éstos podrían continuar atacando la plaga por un largo periodo de tiempo.

En el presente trabajo de investigación, se eligió *L. distinguendus*, ya que en un estudio realizado por Lucas y Riudavets (2002), este himenóptero mostró ser más eficaz que *A. calandreae* parasitando el coleóptero *S. oryzae*. Los resultados obtenidos por Lucas y Riudavets (2002) trabajando con *L. distinguendus*, y a las mismas condiciones ambientales que el presente trabajo, mostraron una reducción de la emergencia de los adultos de *S. oryzae* del 98%, resultado muy similar al obtenido en el presente estudio. En una publicación anterior realizada por Riudavets y Lucas (2000), en la cual se trabajó con *L. distinguendus* y *A. calandreae*, se observó que, a las mismas condiciones ambientales que el presente trabajo de investigación,

la reducción de la emergencia de los adultos de *S. oryzae* era de un 57%. La diferencia entre los resultados de los dos estudios era que, la proporción de hembras en el presente estudio era mayor (70%) que en el estudio de Riudavets y Lucas (2000) (62%). Como consecuencia, la reducción de la población del coleóptero fue más elevada en el presente estudio que en el de Riudavets y Lucas (2000). Además, en su estudio, Riudavets y Lucas (2000) emplearon una relación adultos *S. oryzae*/adultos parasitoide superior al presente estudio. Concretamente, estos autores (Riudavets y Lucas (2000)) trabajaron con una relación de 12/1, mientras que en el presente estudio ésta era de 3,4/1.

Tanto el tratamiento Biológico, como los tratamientos en los que se aplicaba CO₂, y en los que se combinaba el tratamiento Biológico con los de CO₂, redujeron significativamente el número total de insectos con respecto al Testigo (Figura 1.12). Sin embargo, los tratamientos Presión, Biológico + AMs y Biológico + Presión con CO₂ llegaron a controlar, tanto la plaga como al enemigo natural. En cuanto a *S. oryzae*, en los tratamientos en los que se aplicó CO₂ a alta presión, este resultado fue el esperado ya que en un estudio previo realizado por Riudavets *et al.* (2010) se demostró que el tratamiento con CO₂ a 20 atm de presión durante 60 min, controlaba todos los estadios de desarrollo del coleóptero. En el presente trabajo se ha comprobado el resultado de Riudavets *et al.* (2010) y, además, se ha demostrado que con este tratamiento se consigue el 100% de mortalidad del parasitoide. No obstante, Riudavets *et al.* (2009), trabajando a las mismas condiciones ambientales que el presente estudio, demostraron que el tratamiento de larvas-pupas de *S. oryzae* con AMs con 90% CO₂ / 3% O₂ / 7% N₂ durante 12 días, controlaba al insecto. En nuestro estudio, en el tratamiento con AMs se utilizó la misma mezcla de gases y el tiempo de tratamiento fue de 12 días. Sin embargo, la menor relación Volumen arroz: Volumen gas en el interior de las bolsas de nuestro estudio hizo que, probablemente, la mortalidad fuera ligeramente inferior al 100%. Concretamente, ésta fue del 94,2%. En el estudio de Riudavets *et al.* (2009) el peso de arroz en cada repetición era de 50 g, mientras que en el presente estudio era de 83 g. Los resultados obtenidos en los tratamientos Biológico + AMs y Biológico + Presión demuestran que los tratamientos con CO₂, llegaron a controlar al enemigo natural. Esto nos indica que si se aplicara control biológico en el cereal almacenado durante un periodo de tiempo largo, con *L. distinguendus*, al final de este periodo se podría realizar un tratamiento con CO₂ para eliminar, tanto los parasitoides como los insectos plaga que pudieran haber quedado.

En todos los tratamientos realizados se observó una significativa reducción de la pérdida de peso del arroz al final del ensayo, siendo la menor en el tratamiento Biológico + Presión (<2%) (Figura 1.13). En el tratamiento Biológico, la pérdida de peso del arroz fue de 3,6%, resultado muy similar al de los tratamientos Presión y Biológico + AMs, entre los cuales no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, en el tratamiento Biológico se observó una pérdida de peso significativamente inferior a la del tratamiento AMs, a pesar de que en el tratamiento Biológico la media del número total de adultos de *S. oryzae* emergidos al final del tratamiento, fue superior al del tratamiento con AMs. Esto podría explicarse porque las hembras del parasitoide seleccionan las larvas más grandes o los granos de arroz de mayores dimensiones, ya que en ellos podría desarrollarse un individuo más grande (Steffan, 1963). La posible selección de estas larvas y/o de granos de mayores dimensiones, por parte del parasitoide en el tratamiento Bio-

lógico, habría provocado que no se desarrollaran larvas grandes, las cuales habrían consumido una mayor cantidad de arroz. Debido a ello, en el tratamiento Biológico se produjo, probablemente, una menor pérdida de peso del arroz. Además, aunque el número de individuos en el tratamiento Biológico fuera ligeramente superior al del tratamiento AMs, los individuos eran, probablemente, de menor peso que los de AMs (Lucas y Riudavets, 2002). Estos individuos habrían consumido menos cantidad de arroz. El valor de la pérdida de peso del tratamiento Biológico + Presión fue significativamente inferior, comparado con el resto de tratamientos. La pérdida de peso del arroz fue inferior en este tratamiento que en el Biológico + AMs debido, posiblemente, a que el tratamiento con CO₂ a alta presión tiene un efecto más rápido sobre el insecto que el de AMs (Navarro, 2006). En el proceso de descompresión de la cámara de alta presión, en la cual se realiza el tratamiento, uno de los principales efectos del CO₂ sobre el insecto es la rotura de las paredes de las células del insecto, lo cual implica una muerte rápida del individuo. Aunque entre los tratamientos AMs y Presión no se observaron diferencias significativas, al combinar estos tratamientos con el Biológico, se observó que el efecto del parasitoide adicionado al tratamiento a presión mejoró el efecto sobre el insecto, con respecto al tratamiento Biológico + AMs. La pérdida de peso del arroz en el Testigo, al cabo de 10 semanas, fue de un 15,27% con respecto al peso inicial. Sittisuang y Imura (1987), trabajando a unas condiciones ambientales de 30 ± 0,5 °C y 65 ± 0,5% HR, observaron una pérdida de peso del arroz ligeramente superior a la observada en el presente trabajo. Concretamente, ellos observaron una pérdida del 19% al cabo de 14 semanas. Esta diferencia se debió, probablemente, a que la temperatura a la que hicieron los ensayos era 5 °C más elevada que en el presente estudio, lo cual favoreció el desarrollo de los insectos. Y, además, el periodo de tiempo en el que se evaluó este parámetro fue de 4 semanas más que en el presente estudio.

A nivel industrial, estos valores implicarían una elevada pérdida de peso del arroz durante el tiempo de almacenamiento del cereal en los silos. Por ejemplo, para 1 t de arroz almacenado durante 10 semanas, el 15,27% de pérdida de peso representaría unos 152 kg, en las mismas condiciones ambientales que las del presente trabajo. Si a este arroz almacenado se le hubiera aplicado CB, la pérdida de peso se habría reducido hasta el 3,6%, lo que representarían 36 kg. Aplicando los tratamientos Biológico + AMs o Biológico + Presión las pérdidas de peso serían de 32,1 kg y 16,3 kg, respectivamente. Esto nos indica que, tanto el CB como los tratamientos con CO₂, y la aplicación de ambos (Biológico + AMs o Biológico + Presión) para el control del gorgojo del arroz, representarían una importante reducción de las pérdidas de peso del cereal almacenado, lo que se traduce en una importante reducción de las pérdidas económicas.

5.2 Evaluación del efecto del control biológico mediante el parasitoide *Trichogramma evanescens* y los tratamientos con CO₂, para el control de *Ephestia kuehniella* y *Plodia interpunctella*

Al igual que en los tratamientos con *S. oryzae*, en el interior de las bolsas de los tratamientos AMs y Biológico + AMs, sobre *E. kuehniella* y *P. interpunctella*, se produjo una disminución de la concentración CO₂, la cual se atribuye a la disolución de este gas en las grasas y humedad del sustrato alimentario, y en los insectos (Tablas 1.3, 1.4, 1.5 y 1.6). En estos tratamientos también se produjo un incremento de la concentración de O₂ a día 4, que podría atribuirse a la

liberación del O₂ que hubiera podido estar entre las partículas de harina, desde el inicio de los tratamientos (Tablas 1.3, 1.4, 1.5 y 1.6). En este caso, este incremento tampoco se considera relevante, ya que fue de 2,11% para los tratamientos de los dos insectos, y a nivel industrial, niveles de O₂ de entre un 3% y un 5% en el interior de los envases o recipientes, se consideran aceptables.

La máxima emergencia de adultos de *E. kuehniella* se produjo entre las semanas 9 y 13 del ensayo (Figura 1.14), y en *P. interpunctella* entre las semanas 8 y 13 (Figura 1.17), siendo la semana 10 en la que se obtuvo un mayor número de adultos emergidos, tanto de *E. kuehniella* como de *P. interpunctella*. En estos periodos de tiempo, fue cuando se observó, en el tratamiento Biológico, una significativa disminución de la población de los dos lepidópteros, debido a la acción del parasitoide *T. evanescens*. El número acumulado de parasitoides adultos emergidos a lo largo del ensayo fue muy parecido en los dos lepidópteros. Concretamente, en huevos de *E. kuehniella* fue de 130, mientras que en huevos de *P. interpunctella* fue de 134. Sin embargo, el número acumulado de adultos de *E. kuehniella* emergidos a lo largo del ensayo fue de 65,1, mientras que el de adultos de *P. interpunctella* fue de 23,4. Este resultado nos confirma que la mortalidad de las larvas de *P. interpunctella*, los huevos de las cuales no habían estado parasitados, fue debida, probablemente, a la dieta y a la competencia territorial entre ellas. No se observó una segunda generación del parasitoide, lo cual indica que la aplicación de éste para el control de las plagas, debería hacerse por inundación, ya que éste no ha perdurado de una generación a la siguiente.

Tanto la supervivencia de los individuos de *E. kuehniella* como los de *P. interpunctella* fue reducida significativamente en todos los tratamientos, con respecto al Testigo (Figuras 1.15 y 1.18). En el tratamiento Testigo del ensayo de *E. kuehniella*, emergió un 30,3% de adultos con respecto al número inicial de huevos, mientras que en el tratamiento Testigo de *P. interpunctella*, emergieron tan sólo un 10,8 % de individuos. Este resultado puede ser explicado porque en los ensayos se utilizó harina integral de trigo, la cual es el ingrediente principal de la dieta en la que se cría *E. kuehniella* en el laboratorio. En un estudio realizado por Fraenkel y Blewett (1946), trabajando a unas condiciones ambientales de 25 °C de temperatura y 70% de HR, se demostró que la harina integral de trigo es una dieta óptima para el buen desarrollo de las larvas de *E. kuehniella*.

La harina integral de trigo, la cual contiene la capa de aleurona y el germen de los granos, tiene un contenido de proteínas idóneo para el buen desarrollo de este insecto. En cambio, aunque *P. interpunctella* puede atacar productos derivados de los cereales, como por ejemplo la harina, se alimenta, principalmente de granos de cereales, frutas desecadas y frutos secos (Fraenkel y Blewett, 1946; Williams, 1964). Las larvas de este lepidóptero comen el germen y el salvado del grano de cereal, pero no son capaces de alimentarse del almidón del endospermo del grano (Burges y Haskins, 1964; Madrid y Sinha, 1982). Además, la dieta en la que se cría en el laboratorio de Entomología del IRTA, tal y como se ha explicado en el apartado de Material y métodos de este capítulo, no contiene harina integral de trigo. Johnson *et al.* (1992), trabajando a unas condiciones ambientales de 25 ± 0,5 °C y 50 ± 5 % de HR y un fotoperiodo 14:10 h (L:O), demostró que la supervivencia de *P. interpunctella* era muy elevada cuando se uti-

lizaban dietas que contenían como ingrediente principal frutos secos. Este autor comprobó que en una dieta de almendras, la supervivencia de este lepidóptero era del 87,4% y en una dieta de pistachos ésta era del 84%.

Por otra parte, cuando las densidades de población de *E. kuehniella* son elevadas, aunque haya suficiente dieta, se puede producir una elevada mortalidad de las larvas del primer y segundo estadios, debido a que tienen un comportamiento muy territorial (Daumal, 1987). En el caso de las larvas de *P. interpunctella*, éstas también se muestran intolerantes y agresivas con las demás al defender su espacio, cuando la densidad de éstas es elevada (Gage, 1995). Marco *et al.* (1993) recomiendan que, para que las larvas puedan crecer bien, al hacer la cría de *E. kuehniella*, se ponga una densidad de 2 huevos por gramo de dieta. En las repeticiones del presente estudio se pusieron unos 11 huevos por gramo de dieta, hecho que podría haber ayudado a producir la elevada mortalidad de las larvas del lepidóptero, en el tratamiento Testigo.

En cuanto al peso de los residuos producidos por las larvas de los lepidópteros a lo largo del ensayo, en el tratamiento Biológico éste fue significativamente inferior al del Testigo (Figuras 1.16 y 1.19). En los tratamientos con CO₂, prácticamente, no hubo presencia de residuos. En cuanto al Testigo del ensayo de los tratamientos con *E. kuehniella*, el peso de los residuos fue de 8,04 g, lo que indica que a partir de una baja densidad huevos, y a unas condiciones ambientales similares a las del presente trabajo, se podría obtener una importante cantidad de residuos. En este caso, a partir de 100 huevos sembrados en harina se producirían 3,7 g de residuos. Teniendo en cuenta que una hembra puede llegar a poner unos 300 huevos a lo largo de su vida (Arbogast *et al.*, 1980), las larvas de éstos podrían llegar a producir unos 11,2 g de residuos. En cuanto al ensayo con *P. interpunctella*, el peso de los residuos del testigo fue de 7,3 g, lo que indica que a partir de 100 huevos de este lepidóptero sembrados en harina integral, se podrían obtener 3,4 g. Teniendo en cuenta que una hembra de *P. interpunctella* puede llegar a poner hasta un máximo de 400 huevos a lo largo de su vida (Tzanakakis, 1959), a partir de éstos se podrían llegar a producir 13,5 g de residuos. Los resultados obtenidos nos indican que el lepidóptero *P. interpunctella* produce un peso de residuos por adulto emergido, 2,5 veces superior al de *E. kuehniella*. Concretamente, *P. interpunctella* produce 0,3 g de residuos/adulto emergido, mientras que *E. kuehniella* produce 0,12 g de residuos/adulto emergido. Este resultado nos podría indicar que algunas larvas de *P. interpunctella* que se habían empezado a desarrollar y, por consiguiente, habían producido sedas, más tarde habrían muerto por alguna de las causas expuestas anteriormente. Los residuos producidos por estas plagas representan un grave problema para la industria, ya que aparte de dar desprestigio a la marca comercial por su presencia, su acumulación en la maquinaria de procesado del producto, puede llegar a dañar algunos componentes de ésta. Ello deriva en una importante necesidad de control de estas plagas.

5.3 Depredación de *Blattisocius tarsalis* sobre *Ephestia kuehniella*

El depredador *B. tarsalis* empezó a reducir significativamente el número de pupas de *E. kuehniella* desarrolladas, a partir de la proporción de adultos de *B. tarsalis*/huevos de *E. kuehniella* de 0,1, es decir en las cajitas donde había 2 depredadores y 20 huevos del lepidóptero

(Figura 1.20). No se observaron diferencias significativas entre las proporciones de 1 y 2, donde había 20 y 40 adultos de *B. tarsalis* en cada cajita. Este resultado podría haber sido debido a que una alta densidad de adultos del depredador habría provocado una competencia entre ellos en el momento de compartir los recursos alimenticios, o que un huevo podría haber sido comido o dañado por más de un ácaro. En un estudio realizado por Nielsen (1999), se demostró que, trabajando a unas condiciones ambientales de 25 °C de temperatura y 75% de HR, la mayoría de los huevos de *E. kuehniella* depredados por *B. tarsalis* estaban parcialmente comidos. Esto indica que otro ácaro también podría depredar este mismo huevo. Estas causas también pueden explicar el hecho de que en la proporción 0,05 de adultos de *B. tarsalis*/huevos de *E. kuehniella*, en la cual había la presencia de un solo ácaro, la mortalidad de huevos de lepidóptero por ácaro fuera de 1,4 huevos, mientras que en la proporción de 2, donde había 40 ácaros, ésta fuera de 0,21 huevos. En el estudio de Nielsen (1999), se observó que 1 ácaro dañaba unos 4,3 huevos de *E. kuehniella* al día, en cambio Riudavets, *et al.* (2002b), trabajando a las mismas condiciones ambientales que las del presente trabajo, observaron que 1 ácaro dañaba unos 2,5 huevos de *E. kuehniella* al día. La diferencia observada entre los resultados del presente estudio y los de estos autores, puede ser explicada porque en el presente trabajo había presencia de harina en las cajitas. En los experimentos de Nielsen (1999) y Riudavets *et al.* (2002b), en las cajitas sólo había los huevos sin harina. Con lo cual, la presencia de esta harina podría haber dificultado la detección de los huevos del lepidóptero por parte del ácaro.

Al reducir la población de *E. kuehniella*, es decir, al aumentar la proporción de adultos de *B. tarsalis*/huevos de lepidóptero, disminuyó la proporción de residuos obtenidos (Figura 1.21). Concretamente, a partir de la proporción de 0,1 fue cuando se observó una disminución significativa del peso de los residuos con respecto al testigo. En cuanto a las proporciones más elevadas (1 y 2) se observó, al igual que en el recuento de pupas, que no existían diferencias significativas entre las dos proporciones. Esto se atribuye a las causas expuestas en el párrafo anterior.

Tal y como se observó en la producción de residuos, al aumentar la proporción adultos *B. tarsalis*/huevos de lepidóptero, se produjo una disminución de la pérdida de peso de harina (Figura 1.22). Al igual que en el número de pupas y en la producción de residuos, a partir de la proporción 0,1 fue cuando se observó una disminución significativa de la pérdida de peso de la harina con respecto al control.

5.4 Tratamientos con CO₂ sobre *Blattisocius tarsalis*

En los tratamientos con AMs a presión atmosférica, la evolución de la mezcla de gases en el interior de las bolsas nos confirmó el buen comportamiento del material de éstas a lo largo de los tiempos de tratamiento (Tabla 1.7). En los tratamientos a 1 día, la reducción de la concentración de CO₂ fue significativamente inferior a la inicial. Sin embargo esta reducción fue de tan solo un 1,5%, la cual se atribuye a la variabilidad del ensayo. En los tratamientos a 2 y 3 días, las concentraciones de CO₂ y O₂ se mantuvieron constantes a lo largo de los tres tiempos de exposición a las AMs. En estos tratamientos, la concentración de CO₂ varió menos que en los de *S. oryzae*, *E. kuehniella* y *P. interpunctella*. Este resultado se puede atribuir, principalmente,

a que en los tratamientos sobre el coleóptero y los lepidópteros había presencia de dieta en las muestras, en la cual se pudo producir la disolución de un porcentaje CO_2 .

En cuanto a los tratamientos con AMs a presión atmosférica, se obtuvo un 100% de mortalidad de todos los estadios de desarrollo del ácaro con un tiempo de tratamiento de 3 días (Tabla 1.8). Este tiempo es inferior al necesario para eliminar los estadios pre-imaginales de *E. kuehniella*, el cual es de 4 días (Riudavets *et al.*, 2006). Así, en una industria, al aplicar AMs durante un mínimo de 4 días al producto antes de ser envasado y en las mismas condiciones ambientales que en este estudio, se controlarían los estadios pre-imaginales de la plaga, y todos los estadios de desarrollo de *B. tarsalis*, es decir, se controlarían todos los artrópodos vivos presentes en el producto final. En su estudio, Riudavets *et al.* (2009) indican que los tratamientos con AMs se podrían aplicar en los silos o en los almacenes, antes de que el producto se procesara, en el envasado del producto final o, durante el transporte del producto envasado.

El tiempo mínimo de tratamiento con CO_2 a alta presión para obtener el 100% de mortalidad de todos los estadios de desarrollo del ácaro, fue de 10 min (Tabla 1.9). Este tiempo es inferior al necesario para eliminar los estadios de desarrollo pre-imaginales del lepidóptero, para los cuales se necesita un tiempo mínimo de tratamiento de 15 min (Riudavets *et al.* 2006; Locatelli *et al.*, 1999). Estos resultados nos indican que en una industria, y con las mismas condiciones ambientales que las del presente estudio, se podría aplicar un tratamiento de CO_2 a presión justo antes de envasar el producto, y con ello se conseguirían controlar todos los estadios de desarrollo, tanto de la plaga como del depredador. Es decir, se controlaría la presencia de artrópodos vivos en el producto final. Los tratamientos con CO_2 a presión podrían ser aplicados tanto en la entrada del producto sin procesar a fábrica, como justo antes del envasado, para eliminar la presencia de artrópodos (Riudavets y Quero, 2003).

6. Conclusiones

1. Al aplicar control biológico y tratamientos con CO₂ se consigue el 100% de mortalidad de la población de *S. oryzae* y se produce una reducción significativa de la pérdida de peso del arroz respecto a los tratamientos con CO₂, solamente.

2. El control biológico, con el parasitoide *T. evanescens*, y los tratamientos con CO₂ a altas concentraciones, produce un 100% de mortalidad de la población de *E. kuehniella* y *P. interpunctella* y, como consecuencia, reduce significativamente la producción de residuos por parte de los lepidópteros.

3. El depredador *B. tarsalis* se muestra eficaz como agente de control biológico de *E. kuehniella*, ya que reduce significativamente las poblaciones del lepidóptero, la producción de residuos producidos por éste y la reducción del peso de la harina, a partir de la proporción adultos *B. tarsalis*/huevos lepidóptero, de 0,1.

4. El tiempo de tratamiento necesario para alcanzar el 100% de mortalidad de todos los estadios de desarrollo de *B. tarsalis* con atmósferas modificadas a alta presión y a presión atmosférica es de 10 min y 3 días, respectivamente, e inferior al necesario para eliminar los estadios preimaginales de *E. kuehniella*.

CAPÍTULO 2

Toxicidad de las atmósferas modificadas con alto contenido de dióxido de carbono y adición de dióxido de azufre sobre dos especies plaga de productos alimentarios almacenados: *Sitophilus oryzae* y *Tribolium confusum*



1. Introducción

Durante su almacenamiento, las materias primas alimentarias pueden verse afectadas por plagas de insectos y, además, esta contaminación puede ser visible al consumidor debido a la presencia de los propios insectos o de sus restos en el producto final. Actualmente, el número de materias activas oficialmente registradas para el control de plagas, así como el LMRs permitidos en los alimentos son cada vez más restrictivos. Debido a ello, surge la necesidad de encontrar alternativas para el control de plagas en los productos alimentarios almacenados.

Las AMs aplicadas a presión atmosférica con alto contenido en CO₂ ofrecen un método alternativo adecuado, seguro y respetuoso con el medio ambiente para el control de las plagas que afectan a los productos alimentarios (Navarro, 2006). Las AMs pueden ser aplicadas en las estructuras herméticas de las diferentes etapas de la elaboración de los alimentos, ya sea, desde el almacenamiento de materias primas y semielaborados a granel, hasta el proceso de envasado del producto final. La principal ventaja de utilizar AMs con elevado contenido de CO₂ es que es un método eficaz para el control de una amplia gama de especies de plagas de insectos y ácaros, y se puede utilizar para el tratamiento de diferentes productos alimentarios, sin la acumulación de residuos tóxicos después del tratamiento.

Sin embargo, el control de los insectos utilizando AMs puede implicar tiempos de tratamiento relativamente largos, que no cumplirían en determinadas ocasiones, con los requisitos de la industria alimentaria. Por ello, es necesario desarrollar alternativas que no requieran tiempos de tratamiento tan largos pero que sean igualmente efectivos.

Los efectos tóxicos del CO₂ en las especies plaga son conocidos, y los resultados de la acción de diferentes tipos de tratamientos con CO₂, así como sus dosis y condiciones particulares de aplicación, están descritos para un gran número de especies y estados de desarrollo de plagas de insectos y ácaros, de productos alimentarios almacenados (Banks y Annis, 1990; White *et al.*, 1995; Riudavets *et al.*, 2009; Navarro, 2012). El tiempo de exposición recomendado, para conseguir un control de las plagas, puede ser de entre varios días a semanas, dependiendo de la concentración de CO₂, la temperatura y la fase de desarrollo del insecto (Fleurat-Lessard, 1990). Por ejemplo, para controlar una de las especies plaga más resistente a las AMs, el gorgojo del arroz *S. oryzae*, los valores estimados del tiempo letal para conseguir el 95% de mortalidad de los insectos (LT₉₅) varían en un rango de 1 a 4 días para los adultos y entre 3 y más de 5 días para los huevos, aplicando entre 40% y 100% de CO₂ (25 °C) (Annis y Morton, 1997). Para alcanzar el 100% de mortalidad de todos los estadios de desarrollo de esta especie, utilizando una AM con el 90% de CO₂ (25 °C), se requieren 12 días de tratamiento (Riudavets *et al.*, 2009). Existen especies menos tolerantes al CO₂, como por ejemplo, el coleóptero *T. confusum*, la cual es una de las especies plaga más importantes de harinas y de alimentos para animales. El estado de pupa es el más resistente a los tratamientos, requiriendo 8 días de tratamiento con una AM con un contenido del 90% de CO₂ (25 °C) (Riudavets *et al.*, 2009).

Aprovechando uno de los principales efectos que ejerce el CO₂ en los insectos, la apertura permanente de sus espiráculos (Nicolas y Sillans, 1989; Mitcham *et al.*, 2006), se han realizado estudios para evaluar el efecto tóxico sinérgico del CO₂ combinado con otros compuestos. Por ejemplo, la adición de CO₂ a ciertos fumigantes como el acrilonitrilo, el bromuro de metilo, la fosfina o el cianuro de hidrógeno, aumenta su toxicidad y permite la reducción de los tiempos de tratamiento (Bond y Buckland, 1978).

El dióxido de azufre (SO₂) es un gas que está incluido en la lista positiva de aditivos alimentarios (E-220), en un gran número de países y para varios productos alimentarios no perecederos, tales como subproductos de cereales, frutos secos y frutas desecadas (FDA, 2012; The European Commission, 2012). Aunque el SO₂ tiene una larga historia como conservante de alimentos, debido a sus propiedades antimicrobianas, también se ha utilizado para el control de algunas plagas de insectos (Brieger, 1918), como por ejemplo, las plagas de productos alimentarios almacenados, *P. interpunctella* y *E. kuehniella* (Peters, 1936). Más recientemente, el SO₂ ha sido aplicado para el control de plagas de insectos en uva, durante su almacenamiento (Yokoyama *et al.*, 2001). La fumigación con SO₂ (aplicado de forma rutinaria para el control de hongos), sólo o combinado con CO₂, puede ser un buen tratamiento para el control de plagas de insectos. Sin embargo, este tipo de aplicación ha sido poco investigada (Vota, 1957). Únicamente, Vail *et al.*, (1992) observaron, en un estudio a nivel de laboratorio, que las concentraciones de SO₂ utilizadas habitualmente en la fumigación de uvas, eliminaron la plaga más importante de este producto, *Platynota stultana* Walshingham (Lepidoptera: Tortricidae), lo que sugiere que el SO₂ tiene potencial para controlar tanto hongos como insectos. Asimismo, un trabajo preliminar realizado con *S. oryzae* en arroz, también mostró esta característica del SO₂ para el control de plagas (Riudavets *et al.*, 2008).

2. Objetivo

Determinar en qué medida, la adición de un rango de concentraciones de SO₂ a mezclas de gases con alto contenido en CO₂ podría incrementar el efecto insecticida de estas atmósferas modificadas, para el control de dos especies plaga de productos almacenados, *S. oryzae* y *T. confusum*, en diferentes sustratos alimentarios.

3. Material y Métodos

3.1. Crías de los insectos a escala de laboratorio

En los experimentos, se utilizaron insectos de las crías que se mantienen en el laboratorio de Entomología del IRTA de Cabriels.

Sitophilus oryzae fue elegido como modelo de las plagas de granos de cereal, ya que su desarrollo se produce en el interior del grano, y *T. confusum* como modelo de las plagas de subproductos de cereales, como por ejemplo, las harinas. El desarrollo de *T. confusum* se realiza fuera del grano y su alimentación es a base de productos desmenuzados derivados de los cereales. *Sitophilus oryzae* fue criado en arroz integral, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2 del Capítulo 1 y, *T. confusum* en harina de trigo y levadura de cerveza. Para la realización de la cría de *T. confusum* se siguió la misma metodología que la de la cría de *S. oryzae* (apartado 3.2 del Capítulo 1), a diferencia de que el sustrato alimentario de *T. confusum* era harina integral de trigo y levadura de cerveza.

3.2. Evaluación de la adición de SO₂ a atmósferas modificadas con alta concentración de CO₂ sobre la mortalidad de *Sitophilus oryzae* y *Tribolium confusum*

Los adultos y los huevos de *S. oryzae*, y los adultos de *T. confusum* fueron tratados por separado. En cambio, las larvas y las pupas de *S. oryzae*, que tienen un desarrollo interno en el grano, se evaluaron de forma conjunta (referidas como “larvas-pupas”). Todos los ensayos de laboratorio se realizaron en una cámara climática a 25 ± 2 °C y 70 ± 10% de HR.

En el laboratorio, se evaluaron los efectos de dos AMs con alto contenido de CO₂ (70% de CO₂ y 95% de CO₂), aplicadas a presión atmosférica, en combinación con diferentes concentraciones de SO₂ (0 a 30 000 ppm), sobre la mortalidad de todos los estadios de desarrollo de *S. oryzae* y de los adultos de *T. confusum*.

Las arenas experimentales consistieron en cajitas de plástico aireadas (descritas en el apartado 3.5 del Capítulo 1) que contenían 50 g de arroz integral, 20 g de harina de trigo o sin sustrato alimentario, dependiendo del tratamiento. La cara interior de la pared de las cajitas se pintó con una sustancia (Fluon™) que al secarse, forma una película lisa, sobre la cual los insectos resbalan. Con lo cual, se evita que éstos se escapen durante el tratamiento. Después, se añe-

dieron 50 individuos a las arenas, salvo para los huevos y las larvas-pupas de *S. oryzae*, en cuyo caso la dieta fue previamente infestada con adultos (410 adultos/kg de arroz integral durante 7 días) para producir, por lo menos, 50 individuos en los granos de cada arena.

Para obtener las distintas AMs evaluadas en el estudio, se utilizaron gases de calidad alimentaria (S.E. Carburos Metálicos, S. A.-Air Products Group) que se prepararon en botellas, y cuyas concentraciones fueron verificadas por S.E. Carburos Metálicos, S. A.-Air Products Group. Las concentraciones de SO_2 que se combinaron con las respectivas AMs fueron: 0 ppm, 150 ppm, 1500 ppm, 4500 ppm, 15 000 ppm, y 30 000 ppm. Las concentraciones iniciales de los gases de las mezclas fueron $70,78 \pm 0,16\% \text{CO}_2 / 5,1 \pm 0,07\% \text{O}_2$ y $95,06 \pm 0,09\% \text{CO}_2 / 5,28 \pm 0,08\% \text{O}_2$, y se balancearon con N_2 a distintas concentraciones, en función del nivel de SO_2 de cada AM. El rango de tiempos de tratamiento a los que fueron expuestos los insectos varió entre 1 y 3 días, dependiendo de la especie, etapa de desarrollo y de los resultados obtenidos en estudios anteriores (Riudavets *et al.*, 2008, 2009). Los insectos fueron expuestos a cada una de las mezclas de gases en desecadores de cristal de 200 mm de diámetro y 7000 mL de volumen (Figura 2.1 A). En cada desecador se ponían tres cajitas sin tapa para cada especie y estado de desarrollo. A las cajitas no se les ponía la tapa para asegurar el buen contacto entre la mezcla de gases y el substrato alimentario con los insectos. Se prepararon 5 desecadores (repeticiones) por mezcla de gases, tiempo de tratamiento y estado de desarrollo del insecto.

Las mezclas de gases, preparadas previamente, se introdujeron en los desecadores de forma continua (barrido con gas), a una presión de 2 bar hasta alcanzar la concentración de gases deseada (Figura 2.1 B). Se utilizó el analizador de gases Abiss modelo TOM 12 para determinar las concentraciones de CO_2 y O_2 dentro de los desecadores, durante el experimento. La concentración de SO_2 no se pudo comprobar al final de los tratamientos pero, tal y como se ha indicado, las mezclas de gases fueron preparadas en botellas y las concentraciones de SO_2 certificadas por la empresa S.E. Carburos Metálicos, S. A.-Air Products Group.

Como control de cada ensayo, se prepararon 5 cajitas con la dieta y los insectos correspondientes pero sin la aplicación de las AMs, para evaluar el porcentaje de mortalidad natural.

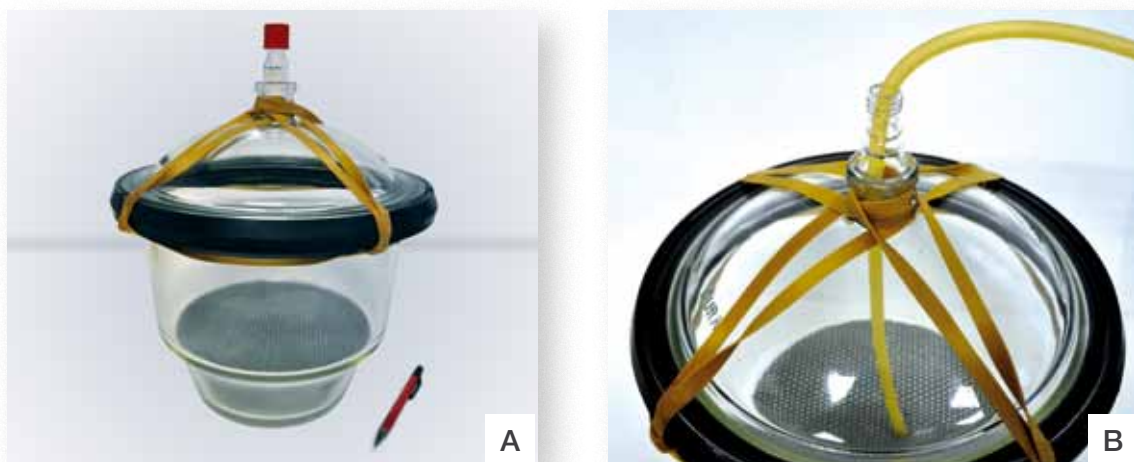


Figura 2.1: (A) Desecador de cristal utilizado en los tratamientos con AMs. (B) Detalle del desecador con el tubo a través del cual se introducía la mezcla de gases.

Después del tratamiento, los desecadores se abrieron y las cajitas se mantuvieron en condiciones ambientales controladas dentro de la cámara climática (25 ± 2 °C y $70 \pm 10\%$ HR). Para evaluar la mortalidad de los adultos, se contó el número de individuos vivos de cada cajita, 24 h después de la finalización del tratamiento. El porcentaje de mortalidad se calculó utilizando el número inicial de individuos colocados en cada cajita. Para los huevos y las larvas-pupas de *S. oryzae*, se contabilizaron los adultos del gorgojo que emergieron después de 9 y 4 semanas, respectivamente. El porcentaje de mortalidad se calculó utilizando el número de individuos que emergieron en las cajitas control.

3.3. Análisis de resultados

Los resultados obtenidos fueron tratados con el paquete estadístico JMP® 10.0.2 (SAS Institute, 2012).

Se calculó la media (\pm error estándar) de las mortalidades obtenidas de cada tratamiento. Para comprobar si existían diferencias significativas entre los porcentajes de mortalidad de los diferentes estadios de desarrollo de las dos especies, para las diferentes condiciones experimentales, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). En caso afirmativo, se efectuó un test de Rango Múltiple de Tukey para comparar las medias. Los resultados, expresados como porcentaje, fueron transformados con la función arcoseno para cumplir con los supuestos del análisis de la varianza: homogeneidad y normalidad.

4. Resultados

4.1 Evolución de las concentraciones de CO₂ y O₂

En las Tablas 2.1 y 2.2 se muestran los resultados de la evolución de las concentraciones de CO₂ y O₂, en el interior de los desecadores, a lo largo del tiempo de tratamiento.

Tanto en los tratamientos con la AM con un 70% de CO₂, como con la AM con un 95% de CO₂, durante 3 días de tratamiento, la concentración de CO₂ se mantuvo constante. Sin embargo, el día 1 del tratamiento se observó una disminución significativa del porcentaje de este gas en las dos AMs debida, probablemente, a la disolución de este gas en la grasa y humedad del sustrato alimentario y/o del insecto (para la AM del 70%: $F= 25,27$; g. l.= 2, 54; $P<0,001$) (para la AM del 95%: $F= 11,67$; g. l.= 2, 184; $P<0,001$) (Tablas 2.1 y 2.2).

En cuanto a la concentración de O₂, no se observaron diferencias significativas de la concentración de este gas en ninguna de las dos AMs, en los días 1 y 3, con respecto al inicio de los tratamientos (para la AM del 70%: $F= 3,92$; g. l.= 2, 54; $P= 0,02$) (para la AM del 95%: $F= 1,38$; g. l.= 2, 184; $P=0,25$) (Tablas 2.1 y 2.2).

Tabla 2.1: Concentración de CO₂ y O₂ (media ± error estándar) en el interior de los desecadores a lo largo de los tratamientos (1 y 3 días). Las concentraciones iniciales de los gases eran: 70,78 ± 0,16 CO₂ / 5,1 ± 0,07 O₂ y balanceada con N₂. La atmósfera podía contener 0 ppm, 150 ppm o 30 000 ppm de SO₂.

Día	[CO ₂] (%)	[O ₂] (%)
0	70,78 ± 0,16 a	5,10 ± 0,07
1	68,29 ± 0,26 b	4,88 ± 0,03
3	70,52 ± 0,22 a	4,56 ± 0,14

Las medias de cada columna seguidas de la misma letra o sin letra, no son significativamente diferentes entre ellas ($P > 0,05$, test Tukey, $n = 5$).

Tabla 2.2: Concentración de CO₂ y O₂ (media ± error estándar) en el interior de los desecadores a lo largo de los tratamientos (1 y 3 días). Las concentraciones iniciales de los gases eran: 95,06 ± 0,09 CO₂ / 5,28 ± 0,08 O₂ y balanceada con N₂. La atmósfera podía contener 0 ppm, 150 ppm, 1500 ppm, 4500 ppm, 15 000 ppm o 30 000 ppm de SO₂.

Día	[CO ₂] (%)	[O ₂] (%)
0	95,06 ± 0,09 a	5,28 ± 0,08
1	92,81 ± 0,13 b	5,16 ± 0,02
3	93,82 ± 0,23 a	5,09 ± 0,06

Las medias de cada columna seguidas de la misma letra o sin letra, no son significativamente diferentes entre ellas ($P > 0,05$, test Tukey, $n = 5$).

4.2. Evaluación de la adición de SO₂ a atmósferas modificadas con alta concentración de CO₂ sobre la mortalidad de *Sitophilus oryzae* y *Tribolium confusum*.

Se observó un 100% de mortalidad de los adultos de *S. oryzae* cuando se añadieron 15 000 ppm y 30 000 ppm de SO₂ a una atmósfera con un 95% de CO₂ y durante 1 día de tratamiento, tanto en presencia de arroz como sin sustrato alimentario (Tabla 2.3). Sin embargo, la eficacia del SO₂ a concentraciones más bajas fue menor y dependió del sustrato alimentario (Tabla 2.3, Figura 2.2). La adición de 150 ppm de SO₂ no mejoró el efecto del CO₂ en la mortalidad de los adultos de *S. oryzae* en comparación con el tratamiento sin SO₂ (Tabla 2.3). En este caso también se observó el efecto de la presencia del sustrato alimentario, en la disminución de la mortalidad ($F=285,02$; g. l.= 11, 179; $P < 0,001$) (Figura 2.2).

En los tratamientos con 1500 ppm y 4500 ppm de SO₂ y la presencia de arroz como sustrato, se observó una significativa disminución de la mortalidad de *S. oryzae*, respecto al tratamiento sin SO₂, reduciendo el efecto letal a sólo el 29% y el 19%, respectivamente (Tabla 2.3). Sin embargo, sin ningún tipo de sustrato alimentario, la disminución de la mortalidad de este insecto sólo fue significativa con la adición de 1500 ppm, mientras que se obtuvo una elevada mortalidad (98,1%) con 4500 ppm de SO₂. En la Figura 2.2 se puede observar este efecto antagónico entre el CO₂ y el SO₂, en el rango intermedio de las concentraciones de SO₂ evaluadas.

Tabla 2.3: Mortalidad (%; media \pm error estándar) de adultos de *S. oryzae* y *T. confusum*, tratados en AMs con un 95% CO₂ combinadas con diferentes concentraciones de SO₂ (0 ppm, 150 ppm, 1500 ppm, 4500 ppm, 15 000 ppm y 30 000 ppm), durante 1 día de tratamiento con diferentes dietas.

Contenido SO ₂ (ppm)	<i>S. oryzae</i>		<i>T. confusum</i>	
	Arroz	Sin dieta	Harina de trigo	Arroz
0	81,2 \pm 1,54 b	99,7 \pm 0,16 a	43,7 \pm 4,58 b	51,5 \pm 8,10 b
150	72,6 \pm 7,27 b	95,9 \pm 0,82 a	45,7 \pm 0,68 b	51,9 \pm 8,11 b
1500	29,3 \pm 2,76 c	72,7 \pm 3,90 b	39,4 \pm 3,49 b	93,4 \pm 1,40 a
4500	18,7 \pm 1,51 d	98,1 \pm 0,65 a	95,6 \pm 0,65 a	100 a
15 000	100 a	100 a	100 a	100 a
30 000	100 a	100 a	100 a	100 a
P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
F	227,12	69,03	303,79	64,52
g. l.	5; 89	5; 89	5; 89	5; 89

Las medias de cada columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre ellas (P>0,05, test Tukey, n= 5).

La presencia del sustrato arroz hizo que la mortalidad de los adultos de *S. oryzae*, fuera significativamente más baja, en comparación con los resultados obtenidos cuando no se añadió sustrato, en todas las concentraciones de SO₂ estudiadas, excepto las más elevadas (15 000 y 30 000 ppm) (F= 285,02; g. l.= 11, 179; P<0,001) (Figura 2.2). Este hecho también se observó en el caso en que no se añadió SO₂ a la mezcla de gases, alcanzándose una menor mortalidad cuando se utilizó arroz como sustrato (81,2%) respecto a cuando no había presencia de sustrato alimentario (99,7%) (Figura 2.2).

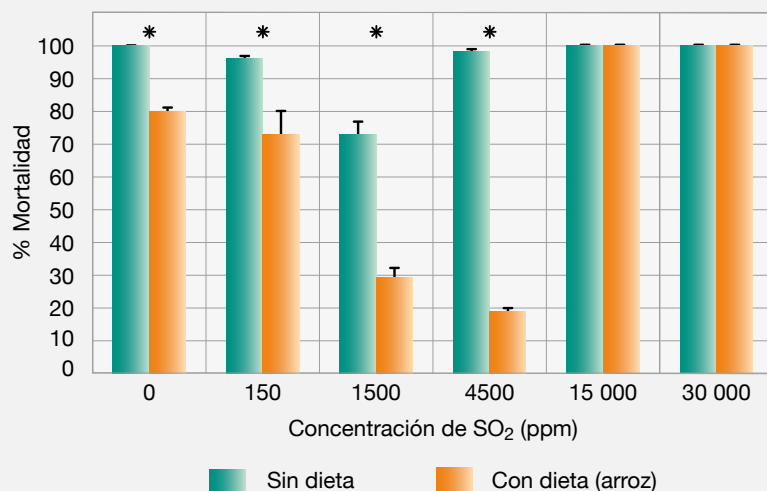


Figura 2.2: Mortalidad (%; Media \pm error estándar) de adultos de *S. oryzae*, tratados en AMs con un 95% de CO₂ combinadas con diferentes concentraciones de SO₂ (0 ppm, 150 ppm, 1500 ppm, 4500 ppm, 15 000 ppm y 30 000 ppm), durante 1 día. Las columnas con color turquesa representan los resultados de las repeticiones sin dieta y las columnas con color naranja de las repeticiones con dieta (arroz). Los asteriscos indican diferencias significativas entre sustratos alimentarios para cada una de las concentraciones de SO₂ (P<0,05, test Tukey, n= 5).

En el caso de los adultos de *T. confusum*, también se observó un 100% de mortalidad, cuando éstos fueron tratados durante un día con la AM con un 95% de CO₂ y las concentraciones más elevadas de SO₂ ensayadas (15 000 y 30 000 ppm), en los dos sustratos alimentarios (Tabla 2.3). Cuando había arroz como sustrato, con 4500 ppm de SO₂, también se observó un 100% de mortalidad de los insectos (Tabla 2.3). A concentraciones más bajas de SO₂ se observaron mortalidades significativamente menores a partir de 1500 ppm de SO₂, cuando había harina como sustrato, y a partir de 150 ppm, cuando el sustrato era arroz (Tabla 2.3, Figura 2.3).

Cuando los adultos de *T. confusum* fueron tratados con la AM sin SO₂, las mortalidades alcanzadas fueron significativamente menores en harina de trigo que en arroz ($F= 202,32$; g. l.= 11, 179; $P<0,001$) (Figura 2.3). Para cada sustrato alimentario, al comparar los tratamientos en los que no había SO₂ en la AM, con los que contenían 150 ppm de SO₂, se observó que éstos eran estadísticamente iguales en cada uno de los sustratos alimentarios (Tabla 2.3). A la concentración de 150 ppm no se observaron diferencias significativas entre los dos sustratos (Figura 2.3).

La adición de 1500 y 4500 ppm de SO₂ con arroz como sustrato, dio lugar a unas mortalidades del 93,4% y del 100%, respectivamente. Sin embargo, cuando se añadieron 1500 ppm de SO₂ a la harina de trigo, la mortalidad de los adultos de *T. confusum* se mantuvo baja (39,4%), y sólo aumentó significativamente con la adición de 4500 ppm de SO₂, siendo todavía significativamente inferior (95,6%) a la observada en el arroz (100%) ($F= 202,32$; g. l.= 11, 179; $P<0,001$) (Tabla 2.3, Figura 2.3).

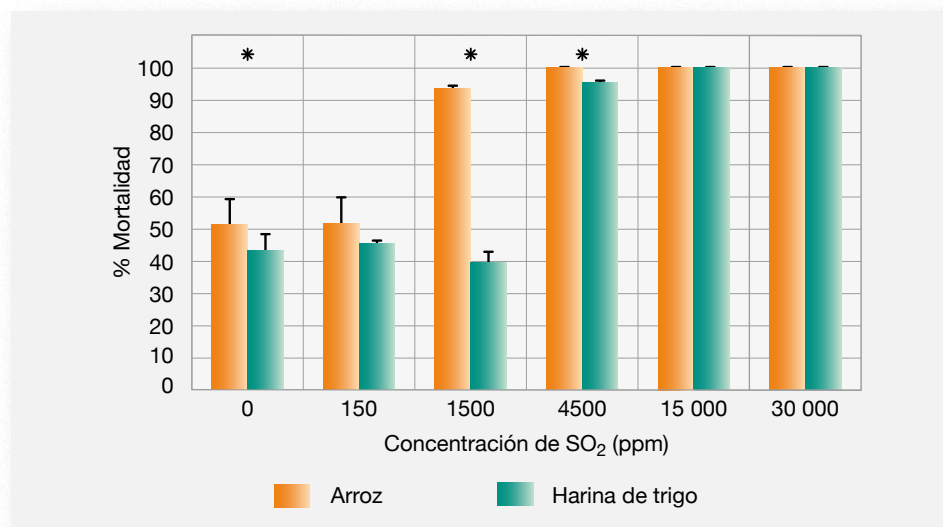


Figura 2.3: Mortalidad (%; media \pm error estándar) de adultos de *T. confusum*, tratados en AMs con un 95% de CO₂ combinadas con diferentes concentraciones de SO₂ (0 ppm, 150 ppm, 1500 ppm, 4500 ppm, 15 000 ppm y 30 000 ppm), durante 1 día. Las columnas con color naranja representan los resultados de las repeticiones con arroz y las columnas con color turquesa, de las repeticiones con harina de trigo. Los asteriscos indican diferencias significativas entre sustratos alimentarios para cada una de las concentraciones de SO₂ ($P<0,05$, test Tukey, $n = 5$).

La adición de SO₂ hizo aumentar de manera significativa y progresivamente, la mortalidad de los huevos y de las larvas-pupas de *S. oryzae*, expuestas al tratamiento con una AM con 95% de CO₂ durante 3 días (Tabla 2.4). La adición de 150 ppm y 1500 ppm de SO₂ a la AM con elevado contenido de CO₂, aumentó ligeramente, pero de forma significativa, la mortalidad de los huevos. La mortalidad de los huevos de *S. oryzae* fue ligeramente superior al 99% con la

adición de 4500 ppm de SO₂. En el caso de las larvas-pupas, la adición de 150 ppm de SO₂ no hizo aumentar la mortalidad, respecto a la atmósfera sin SO₂, pero con la adición de 1500 y 4500 ppm de SO₂ se duplicó la mortalidad, sin superar el 61% en promedio. Con 15 000 ppm de SO₂ se consiguió una mortalidad del 94%. Se alcanzó un 100% de mortalidad con la concentración de 30 000 ppm de SO₂ (Tabla 2.4).

Tabla 2.4: Mortalidad (%; media ± error estándar) de los huevos y las larvas-pupas y de *S. oryzae* tratados en AMs con un 95% de CO₂ y combinadas con distintas concentraciones de SO₂ (0 ppm, 150 ppm, 1500 ppm, 4500 ppm, 15 000 ppm y 30 000 ppm) durante 3 días en arroz.

Contenido SO ₂ (ppm)	<i>S. oryzae</i>	
	Huevos	Larvas-Pupas
0	60,3 ± 2,07 d	25,3 ± 4,08 d
150	68,7 ± 1,62 c	12,7 ± 2,53 e
1500	70,8 ± 1,00 c	53,1 ± 1,64 c
4500	99,3 ± 0,14 b	60,6 ± 2,18 c
15 000	100 a	94,0 ± 0,98 b
30 000	100 a	100 a
<i>P</i>	< 0,001	< 0,001
<i>F</i>	786,42	198,2
g. l.	5; 89	5; 89

Las medias de cada columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre ellas (P>0,05, test Tukey, n= 5).

También se observó un aumento en la mortalidad con la adición de SO₂ a una mezcla de gases con un contenido de CO₂ del 70% (Tabla 2.5). Con 30 000 ppm de SO₂, la mortalidad aumentó significativamente hasta el 100% para todos los estados de desarrollo en ambas especies plaga, excepto para el estado larvas-pupas de *S. oryzae* (Tabla 2.5). Sin embargo, en este estado, la mortalidad también fue elevada (82,7%). Aunque las concentraciones intermedias de SO₂ combinadas con 70% de CO₂ no fueron evaluadas, el contenido más bajo estudiado (150 ppm) no aumentó significativamente la mortalidad, a excepción de los huevos de *S. oryzae*.

Tabla 2.5: Mortalidad (%; media ± error estándar) de huevos, larvas-pupas y adultos de *S. oryzae* y adultos de *T. confusum*, tratados en AMs con un 70% de CO₂ y combinadas con distintas concentraciones de SO₂ (0 ppm, 150 ppm, 1500 ppm, 4500 ppm, 15 000 ppm y 30 000 ppm) durante 1 día (adultos) y 3 días (huevos y larvas-pupas) en arroz (*S. oryzae*) y harina de trigo (*T. confusum*).

Contenido SO ₂ (ppm)	<i>S. oryzae</i>			<i>T. confusum</i>
	Huevos	Larvas-pupas	Adultos	Adultos
0	63,7 ± 1,29 c	30,7 ± 3,01 b	41,7 ± 3,38 b	15,8 ± 1,3 b
150	97,8 ± 0,4 b	31,4 ± 1,74 b	48,2 ± 8,72 b	12,1 ± 0,94 b
30 000	100 a	82,7 ± 1,83 a	100 a	100 a
<i>P</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>F</i>	900,29	155,67	139,37	1727,38
g. l.	2; 44	2; 44	2; 44	2; 44

Las medias de cada columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre ellas (P>0,05, test Tukey, n= 5).

5. Discusión

La concentración de CO₂ al inicio y al final de los tratamientos a 3 días se mantuvo constante (Tablas 2.1 y 2.2). En los tratamientos a 1 día, al final del tratamiento se observó un descenso de la concentración de CO₂, la cual se atribuye a la disolución de este gas en las grasas y humedad del sustrato alimentario y/o de los insectos. Esta disolución de CO₂ es un comportamiento habitual del gas, que se produce durante las primeras horas, después de que un producto ha sido envasado en AM a presión atmosférica.

En cuanto a la evolución de la concentración del O₂ en el interior de los desecadores, ésta no varió en ninguna de las dos AMs (70% y 95% de CO₂) a lo largo de los tratamientos (Tablas 2.1 y 2.2). Estos resultados indicaron una buena estanqueidad de los desecadores.

La adición de SO₂ mejoró la eficacia de las AMs con alto contenido de CO₂, para el control de todos los estadios de desarrollo de *S. oryzae* y de los adultos de *T. confusum*. Este aumento de la eficacia podría permitir una reducción del tiempo de tratamiento. La adición de 15 000 ppm de SO₂ a una AM con 95% de CO₂, redujo el tiempo necesario para alcanzar el 100% de mortalidad, a sólo 1 día de tratamiento, para adultos de *S. oryzae* y *T. confusum* (Tabla 2.3). En un estudio realizado anteriormente, se demostró que los tiempos de tratamiento necesarios para conseguir el 100% de mortalidad de adultos de *S. oryzae* y *T. confusum*, con AMs con altas concentraciones de CO₂ (90% de CO₂ a 25 °C) y sin la adición de SO₂, era de más de 4 días (Riudavets *et al.*, 2009). En otro estudio realizado por Banks y Annis (1990), los tiempos de tratamiento para conseguir el 95% de mortalidad de huevos de *S. oryzae* y adultos de *T. confusum*, era de 3,5 y 2 días, respectivamente, aplicando una AM con un 80% de CO₂. Annis y Morton (1997) demostraron que el tiempo de tratamiento para el control (99% de mortalidad) de los adultos y los huevos de *S. oryzae* era de más de 1 y de 4 días, respectivamente, trabajando a 25 °C.

Además, la adición de SO₂ a una AM con una elevada concentración de CO₂, también permitió una reducción del tiempo de tratamiento de las larvas-pupas de *S. oryzae*, que es el estadio de desarrollo más resistente de esta especie. En el presente estudio, el 100% de mortalidad para este estadio de desarrollo se observó a los 3 días de exposición a 95% de CO₂, combinado con 30 000 ppm de SO₂ (Tabla 2.4). Annis y Morton (1997), utilizando una AM con una concentración de CO₂ del 95%, determinaron que era necesario un tiempo de tratamiento mucho más largo, concretamente de 15,3 días, para el control de este estado de desarrollo. Según Riudavets *et al.*, (2009) sin la adición de SO₂, serían necesarios 8 días para lograr el 100% de mortalidad de pupas de *S. oryzae*, con un tratamiento del 90% de CO₂ y 25 °C. Banks y Annis (1990) también demostraron que para obtener una mortalidad de al menos el 95% de este estadio de desarrollo, se requería un tiempo de tratamiento largo, concretamente, de 8,5 días, con una concentración del 80% de CO₂.

Sin embargo, la adición de concentraciones pequeñas de SO₂ (< 1500 ppm) a una AM con un alto contenido de CO₂, no garantizó en todos los casos, un incremento de su eficacia. Por

ejemplo, la adición de 1500 ppm a una AM con un 95% de CO₂ aumentó significativamente la mortalidad de los huevos y larvas-pupas de *S. oryzae* en arroz (Tabla 2.4). En cambio, la adición de 1500 ppm y 4500 ppm de SO₂ sobre adultos de *S. oryzae* en arroz, provocó el efecto contrario, es decir, se observó una disminución significativa de la mortalidad (Tabla 2.3). En el caso de los adultos de *T. confusum*, al añadir 1500 ppm de SO₂ a la AM, no implicó un aumento significativo de la mortalidad, cuando éstos se trataron en presencia de harina de trigo (Tabla 2.3).

La adición de 150 ppm de SO₂ no hizo aumentar la mortalidad de los adultos y las larvas-pupas de *S. oryzae*, ni la de los adultos de *T. confusum*, pero sí incrementó la mortalidad de los huevos de *S. oryzae*, especialmente con un 70% de CO₂ (Tablas 2.3 y 2.5). Este hecho es importante tenerlo en cuenta, ya que el estadio de desarrollo de huevos de este coleóptero es uno de los que mejor supera el proceso industrial de molienda del cereal y pulido del arroz, mientras que la mayor parte de las pupas y adultos mueren (Lucas y Riudavets, 2000). Cuando los tratamientos se hicieron con una AM con un 70% de CO₂ y con la concentración más baja de SO₂ probada (150 ppm), se observó un mayor aumento de la mortalidad de los huevos de *S. oryzae* (Tabla 2.5), que si en la AM había una mayor concentración de CO₂ (95%) (Tabla 2.4). El efecto sinérgico no fue tan elevado con la concentración más alta de CO₂ debido, probablemente, al efecto de shock que habría provocado el elevado contenido de CO₂ sobre el insecto (Edwards y Batten, 1973; Nicolas y Sillans, 1989). Como consecuencia, si a esta AM se le añade SO₂, el efecto de este gas sobre el insecto se ve atenuado y, por lo tanto, no es tan elevado como sería de esperar. Hay estudios en los que se demuestra que se producen efectos antagónicos. Por ejemplo, se obtuvieron mortalidades bajas al exponer los insectos a altas concentraciones de CO₂ y bajas concentraciones de O₂ (Ali-Niazee, 1971; Mitcham *et al.*, 1997). Se han obtenido resultados similares con otros fumigantes, que al combinarlos con una alta concentración de CO₂, la mortalidad producida era más baja que si éstos se combinaban con una concentración más baja de CO₂ (Bond y Buckland, 1978). La mortalidad del insecto se produce, principalmente, por el efecto que tiene el CO₂ sobre éste, ya que le produce la apertura de los espiráculos. A través de ellos el fumigante penetra mejor en el insecto. Sin embargo, si se produce un efecto narcótico por una exposición a altas concentraciones de CO₂, la mortalidad dependerá principalmente, de los efectos metabólicos que tiene el CO₂ sobre el insecto, de entre los cuales, uno de los más importantes es la variación del pH de los fluidos internos del insecto (Janmaat *et al.*, 2001).

Actualmente, no puede explicarse el efecto antagonista entre el CO₂ y el SO₂ sobre los adultos de *S. oryzae*, con las concentraciones de SO₂ probadas (1500 ppm y 4500 ppm) (Tabla 2.3 y Figura 2.2). Navarro (1978) observó un efecto antagónico entre el CO₂ y el O₂ a bajas concentraciones, sobre la mortalidad de los adultos de *S. oryzae*. Para conseguir el 95% de mortalidad de los adultos de este insecto, necesitó un tiempo de exposición a la AM menor, con un residual de O₂ del 1%, que si este residual era del 0% o del 3%. En el estudio realizado por Simpson *et al.* (2004), también se observó un efecto antagonista, pero en este caso entre el formato de etilo y el CO₂ cuando éstos fueron aplicados para el control de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) y *Tetranychus urticae* Koch en fresas. Este efecto se observó a partir de concentraciones de CO₂ del 40%, aproximadamente, y superiores. Existe poca información

sobre el mecanismo de toxicidad del SO_2 sobre los insectos. Sin embargo, Stratford y Rose (1986) demostraron que el SO_2 es capaz de difundirse a través de los canales de la membrana celular hidrofóbica, sin que actúe ningún otro factor. En un estudio realizado por Mathew *et al.* (2011), se demuestra que durante la oxidación de los sulfitos se producen radicales libres, los cuales provocan una oxidación sistémica. No obstante, se sabe que concentraciones elevadas de CO_2 , detienen la actividad metabólica y aumentan la permeabilidad de la membrana (Bell, 1984; Zhou *et al.*, 2001; Mitcham *et al.*, 2006). Así, según lo expuesto, se puede decir que los mecanismos de actuación del CO_2 y del SO_2 , sobre el metabolismo de los insectos pueden ser muy diversos. Éstos podrían ser sinérgicos en cuanto al aumento de la permeabilidad de la membrana por parte del CO_2 , el cual facilitaría el paso del SO_2 y, posiblemente, a altas concentraciones de SO_2 , el efecto sobre la mortalidad del insecto sería importante. Pero, por otro lado podrían ser antagónicos a bajas concentraciones de SO_2 , por el efecto contrario de los dos gases sobre el metabolismo oxidativo. Así pues, sería interesante llevar a cabo nuevos estudios para poder analizar los mecanismos de actuación del CO_2 y el SO_2 sobre las diferentes especies de insectos y sus estadios de desarrollo.

Además, la presencia de diferentes sustratos alimentarios o la ausencia de éstos en las muestras, modificaron el efecto tóxico del SO_2 sobre los adultos de *S. oryzae* y *T. confusum* (Figuras 2.2 y 2.3). Este resultado podría ser debido a las distintas capacidades de adsorción de los sustratos, lo que implicaría una concentración más o menos elevada del SO_2 disponible en la AM, dependiendo de la adsorción del SO_2 en el producto alimentario (Frickhinger, 1934). Riudavets *et al.* (2008) obtuvieron diferentes curvas de sorción cuando trataron almendras, harina de trigo y arroz con una alta concentración de CO_2 (70%) y un 3% de SO_2 . La harina de trigo alcanzó rápidamente los valores más altos de sorción (hasta 3500 ppm después de 24 h de tratamiento), en las almendras y el arroz se observó una adsorción más baja (un máximo de 2300 ppm después de 7 días de tratamiento). De esta manera, en el caso de la harina, al final del tratamiento habría menos SO_2 disponible en la AM. En el presente estudio, las mortalidades observadas en la harina de trigo fueron más bajas que en el arroz, debido a la más elevada adsorción de la harina de trigo, con respecto a la del arroz. Estos resultados indican la importancia de utilizar más de un sustrato cuando se evalúa la eficacia de las AMs.

Los resultados obtenidos en este capítulo han indicado que la adición de SO_2 a AMs ricas en CO_2 aumenta la eficacia de éstas en el control de insectos. Sin embargo, al aplicar estos tratamientos, debe tenerse en cuenta la dosis máxima permitida de SO_2 en cada alimento. Por ejemplo, en productos derivados de los cereales la concentración máxima permitida es de 50 ppm, en frutos secos 500 ppm, y 2000 ppm en frutas desecadas (The European parliament and the Council of the European Union, 2008). Sin embargo, si después del tratamiento se hace una buena ventilación del producto, la concentración de SO_2 en el alimento, en el momento de su consumo podría llegar a estar por debajo de la dosis máxima permitida, debido al alto nivel de desorción del SO_2 . En su estudio, Riudavets *et al.* (2008) demostraron, a nivel de laboratorio, que justo después de tratar harina de trigo durante 24 h con una AM con 70% CO_2 y concentraciones de SO_2 de 50 ppm o 150 ppm, el nivel de SO_2 ya se encontraba por debajo del nivel máximo permitido, y si después, la harina se dejaba ventilar durante 24 h, el nivel de éste se reducía considerablemente. Tratando la harina con niveles más altos de SO_2 , concretamente

de 30 000ppm, y la misma concentración de CO₂ (70%), el nivel detectado de SO₂ en la harina, justo después de hacer el tratamiento, era inferior a 3000 ppm, y si ésta se dejaba ventilando durante 7 días, se seguía produciendo una importante desorción del gas hasta alcanzar valores inferiores a 500 ppm.

El SO₂ puede producir corrosión, blanqueo y cambios de pH en el material tratado (Frickinger, 1934). Sin embargo, las concentraciones probadas en el estudio de Riudavets *et al.* (2008), no produjeron cambios en el pH, ni en el color del arroz y las almendras (resultados no mostrados). El efecto del SO₂ debería ser objeto de estudio en un futuro próximo. Son conocidos los efectos tóxicos del SO₂ cuando este gas es aplicado a altas concentraciones, por ello se propone utilizarlo a las concentraciones aceptadas en la legislación para su uso en la industria alimentaria (The European Parliament and the Council of the European Union, 2008). Así, las mezclas de CO₂ y SO₂ podrían prepararse en botellas y comercializarse como los demás fumigantes (Emekci, 2010).

Tal y como se ha observado en este trabajo, las diferentes especies y estados de desarrollo de los insectos estudiados tienen diferentes grados de sensibilidad a la mezcla de gases; de esta manera, es probable que, en general, las distintas especies de insectos también tengan diferentes sensibilidades. Por lo tanto, sería necesario determinar la dosis más efectiva para obtener el nivel de control de cada una de las especies plaga. Además, como con otros fumigantes, las temperaturas por debajo de 15 °C tienden a limitar la eficacia de los tratamientos con AMs con un alto contenido en CO₂ (Mann *et al.*, 1999; Sauer y Shelton, 2002; Conyers y Bell, 2006). En cambio, se han realizado estudios, en los que se demuestra que la aplicación de SO₂ a bajas temperaturas, para el control de plagas de uvas de mesa, entre las cuales se encuentran *F. occidentalis*, *Pseudococcus maritimus* (Ehrhom), *P. stultana*, *T. pacificus* McGregor y *T. urticae*, es una alternativa eficaz al uso de fumigantes, tales como el bromuro de metilo (Yokohama *et al.*, 1999; Yokohama *et al.*, 2001). Sería interesante llevar a cabo más trabajos de investigación, en los que se demostrara la eficacia de la aplicación de SO₂ combinado con CO₂ a bajas temperaturas, para el control de plagas de productos almacenados.

6. Conclusiones

1. La adición de SO₂ a atmósferas modificadas ricas en CO₂ aumenta la eficacia de éstas en el control de insectos plaga de productos almacenados.

2. Altas concentraciones de SO₂ (≥ 15 000 ppm) combinadas con un 95% de CO₂ hacen que se reduzca el tiempo de tratamiento para el control de los adultos de *S. oryzae* y *T. confusum*, respecto a la aplicación de atmósferas modificadas sin SO₂, a sólo un día.

3. La adición de altas concentraciones de SO₂ (≥ 15000 ppm) a atmósferas modificadas con una concentración de CO₂ del 95%, aplicadas para el control de larvas-pupas y huevos de *S. oryzae*, hace que disminuya el tiempo de tratamiento, respecto a la aplicación de atmósferas modificadas sin SO₂, a sólo 3 días.

4. El control de los adultos de *T. confusum* con atmósferas modificadas con una alta concentración de CO₂, se consigue adicionando una cantidad de SO₂ más pequeña a las atmósferas modificadas, cuando el sustrato alimentario es arroz, que cuando éste es harina.

5. Se produce un efecto antagónico entre el CO₂ y el SO₂ cuando se tratan huevos de *S. oryzae*, con una atmósfera modificada con un 95% de CO₂ y 150 ppm de SO₂.

CAPÍTULO 3

**Efecto de las atmósferas modificadas
y los bioactivos volátiles sobre el gorgojo
del arroz, *Sitophilus oryzae* (L.)**



1. Introducción

Una de las plagas más importantes del arroz y otros cereales almacenados es el coleóptero *S. oryzae* (Beckett *et al.*, 1994). El uso de productos químicos para su control ha sido el método más utilizado a lo largo de los últimos años. No obstante, el uso de estos productos puede afectar negativamente la salud de los consumidores, así como al medio ambiente. Es por ello que, actualmente el LMRs, así como el número de materias activas permitidas se han visto reducidos (Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, 2014). Como consecuencia, se están buscando alternativas al uso de productos químicos, las cuales sean eficaces y respetuosas con la salud de los consumidores y con el medio ambiente.

Las AMs aplicadas a presión atmosférica, con alta concentración de CO₂, son un método eficaz para el control de estas plagas y, a la vez, es medioambientalmente respetuoso (Navarro, 2006; Riudavets *et al.* 2009; Adler *et al.*, 2000). Riudavets *et al.* (2009), demostraron que para controlar todos los estadios de desarrollo de *S. oryzae* aplicando un tratamiento con AMs con la mezcla de gases 90% CO₂ / 3% O₂ / 7% N₂, se necesitan 12 días de tiempo de tratamiento. Al disminuir la concentración de CO₂ al 50% (3% O₂ y 47% N₂) se requieren más de 12 días para poder controlar todos los estadios de desarrollo de este coleóptero (Riudavets *et al.*, 2009). Sin embargo, una de las desventajas de la aplicación de las AMs es que, en determinadas circunstancias, el tiempo de tratamiento puede resultar demasiado largo. Por ejemplo, para el tratamiento de materias primas o productos finales elaborados que se vayan a utilizar o a comercializar inmediatamente.

Un método que se ha estado utilizando para prevenir las plagas de insectos en granos de cereales y legumbres almacenados, ha sido la mezcla de las materias primas con algunas especies de plantas o partes de éstas (hojas, raíces o extractos), que muestran en mayor o menor grado, actividad insecticida. Ésta ha sido una práctica muy utilizada en algunos países africanos o asiáticos, con dificultad de acceso a los insecticidas químicos de síntesis (FiBL, 2011).

Muchas plantas poseen propiedades insecticidas (Tripathi *et al.*, 1999), principalmente en la forma de aceites esenciales (Shaaya *et al.*, 1991), que son una fuente de bioactivos volátiles (BV). Algunos de estos BV tienen estas propiedades contra especies de insectos plaga. Además, tienen muy baja toxicidad sobre los consumidores y se degradan muy rápidamente (Rajendran y Sriranjini, 2008).

La mayor parte de los BV, son metabolitos secundarios secretados por las plantas, como medio de defensa contra plagas de organismos. Estos BV pueden agruparse en cinco categorías: monoterpenoides, cianohidrinás y cianatos, compuestos del sulfuro, alcaloides (Z-asarona) y otros (salicilato de metilo, derivados del benceno, acetato de bornilo y terpinoleno). Entre los componentes de los aceites esenciales, los monoterpenoides están siendo muy estudiados, debido a la elevada actividad fumigante que poseen contra plagas de insectos de productos almacenados. Ejemplos de estos monoterpenoides son la S-(+)-carvona y el linalol,

los cuales, son los componentes predominantes de los aceites esenciales de *Carum carvi* L. y *Ocimum* spp., respectivamente (Rajendran y Sriranjini, 2008).

López y Pascual-Villalobos (2008), trabajando a unas condiciones ambientales de 30 °C y 51% HR durante un tiempo de tratamiento de 24 h, demostraron que la S-(+)-carvona y el linalol tenían una elevada actividad insecticida contra los adultos de *S. oryzae*. La dosis letal necesaria de S-(+)-carvona y de linalol, para obtener un 95% de mortalidad (LD_{95}) de adultos de *S. oryzae* en 24 h, era de 19,35 mg/L y 214,87 mg/L, respectivamente (López y Pascual-Villalobos, 2008). Estos autores también observaron que la concentración necesaria de S-(+)-carvona para conseguir el 100% de mortalidad de los adultos de *S. oryzae*, en 24 h, era de 32 mg/L. Lee *et al.* (2001) en su estudio observaron que, de los monoterpenoides del aceite esencial de *Mentha arvensis* L., la mentona y el linalol fueron los que mostraron una mayor actividad fumigante contra los adultos de *S. oryzae*, después de 24 h de tratamiento.

Por otra parte, existen BV obtenidos industrialmente y considerados como aditivos GRAS (*Generally Recognized As Safe*) por la *US Food and Drug Administration*. Ejemplos de estos BV son los ácidos grasos volátiles de cadena corta como es el ácido propiónico, el cual tiene propiedades tóxicas contra bacterias Gram negativas (Davidson y Juneja, 1990), contra hongos del grano de cereal almacenado (Raeker *et al.*, 1992) y contra algunos insectos plaga (Germinara *et al.*, 2007; Germinara *et al.*, 2010, Nattudurai *et al.*, 2012; Lorenz *et al.*, 2010). Germinara *et al.* (2007), demostraron que el ácido propiónico tiene actividad insecticida contra *S. granarius* y *S. oryzae*. En las dos especies, la concentración letal para alcanzar un 50% (LC_{50}) y un 95% (LC_{95}) de mortalidad estaba en un rango entre 5 y 10 mg/L aire y, entre 10 y 16 mg/L aire, respectivamente, trabajando a temperaturas entre 23 y 30 °C, durante 24 h de tratamiento (Germinara *et al.*, 2007). También se demostró el efecto repelente contra *S. granarius* en muestras de trigo (Germinara *et al.*, 2010). En este estudio se observó una reducción significativa de la entrada de adultos del coleóptero en envases de cartón con ácido propiónico, respecto al mismo tipo de envases sin el BV. No obstante, uno de los principales inconvenientes de la comercialización de los aceites esenciales para su aplicación como fumigantes es su elevado precio (Korunic *et al.*, 2008).

Por otra parte, se han realizado estudios en los que se demuestra que al combinar CO₂ con fumigantes, como por ejemplo, el bromuro de metilo, la fosfina o el cianuro de hidrógeno, se incrementa el efecto insecticida de éstos en comparación a si se aplican sin CO₂ (Bond y Buckland, 1978). También se han llevado a cabo trabajos de investigación en los que se manifiesta que al añadir CO₂ a ciertos BV, el efecto insecticida de éstos se ve mejorado (Wang *et al.*, 2001; Woltering *et al.*, 2003; Işikber, 2010; Kostyukovsky *et al.*, 2002b; Shaaya *et al.*, 1999). En su estudio, Shaaya *et al.* (1999) demostraron que el aceite esencial SEM76 (de plantas de la familia Lamiaceae) incrementó su toxicidad sobre adultos de *S. oryzae*, *T. castaneum*, *R. dominica* y *O. surinamensis* en presencia de un 15% de CO₂. Los aceites esenciales de la piel de *Citrus* spp. y *Eucalyptus citridora* Hook incrementaron su toxicidad sobre *L. bostrychophila*, en presencia de dos AMs distintas: 15% CO₂ / 1% O₂ / 84% N₂ y 12% CO₂ / 5% O₂ / 83% N₂ (Wang *et al.*, 2001). En otro estudio, se observó que un 92% de CO₂ tenía un efecto sinérgico en la toxicidad del aceite esencial de ajo sobre adultos y pupas de *T. confusum* y *E. kuehniella* (Işikber, 2010).

De esta manera, y teniendo en cuenta las desventajas anteriormente mencionadas respecto a la aplicación de AMs (tiempos de tratamiento demasiado largos) o el uso de BV (elevado precio), contra las plagas de almacén, al combinar ambas tecnologías, sería posible reducir el tiempo de tratamiento y, a la vez reducir la concentración de BV necesaria para controlar a los insectos plaga.

2. Objetivo

Evaluar el control de los adultos de *S. oryzae* al ser tratados con atmósferas modificadas con alta concentración de CO₂ combinadas con tres bioactivos volátiles, dos monoterpenoides (S-(+)-carvona y linalol) y un ácido graso de cadena corta (ácido propiónico).

3. Material y Métodos

Todos los experimentos llevados a cabo en este trabajo de investigación, se realizaron en condiciones ambientales controladas en una cámara climática a 25 ± 2 °C de temperatura, $70 \pm 10\%$ de HR y un fotoperiodo de 16:8 h (L:O).

Los BVs utilizados fueron S-(+)-carvona (pureza= 96%), linalol (pureza= 86%) y ácido propiónico (pureza= 99%) (*VWR International Eurolab, S. L. España*). Los tres BV estaban en forma líquida.

3.1. Cría de *Sitophilus oryzae* a escala de laboratorio

Para llevar a cabo la aclimatación de las dietas se procedió de la misma manera que la descrita en el apartado 3.1 del Capítulo 1.

Los adultos de *S. oryzae* utilizados en la realización de los ensayos del presente trabajo, fueron cogidos de la cría que se mantiene en granos de arroz en el laboratorio de Entomología del IRTA de Cabriels, desde hace más de 10 años. La cría se llevó a cabo procediendo de la misma manera que la descrita en el apartado 3.2.1 del Capítulo 1.

3.2. Evaluación de la combinación de atmósferas modificadas con bioactivos volátiles sobre la mortalidad de *Sitophilus oryzae*

Como arenas experimentales se utilizaron cajitas de plástico transparente (descritas en el apartado 3.5 del Capítulo 1), abiertas cenitalmente y con la cara interior de la pared pintada con Fluon™, para evitar que los adultos del coleóptero pudieran escaparse. En cada cajita se



Figura 3.1: Analizador de gases WITT OXYBABY 6.0.

pusieron 50 g de arroz integral de cultivo ecológico y 50 adultos de *S. oryzae*.

Para obtener la AM se utilizaron gases de calidad alimentaria (S.E. Carburos Metálicos, S. A.-Air Products Group) que se combinaron en el mezclador de gases WITT KM 100-3M/MEM. La media (\pm error estándar) de las concentraciones iniciales de los gases de todos los tratamientos fueron: $51,45\% \pm 0,3 \text{ CO}_2$ / $0,35\% \pm 0,02 \text{ O}_2$ / $48,20 \pm 0,30 \text{ N}_2$. Para analizar la mezcla de gases, se utilizó un analizador de gases WITT OXYBABY 6.0 (Figura 3.1).

Los tratamientos realizados y la nomenclatura utilizada (entre paréntesis), fueron los que se indican a continuación:

- Arroz con adultos de *S. oryzae* (Testigo)
- Arroz con *S. oryzae* tratado con atmósfera modificada (AM)
- Arroz con *S. oryzae* tratado con BV, S-(+)-carvona (BV-C)
- Arroz con *S. oryzae* tratado con BV, linalol (BV-L)
- Arroz con *S. oryzae* tratado con BV, ácido propiónico (BV-P)
- Arroz con *S. oryzae* tratado con AM combinada con BV, S-(+)-carvona (AM-BV-C)
- Arroz con *S. oryzae* tratado con AM combinada con BV, linalol (AM-BV-L)
- Arroz con *S. oryzae* tratado con AM combinada con BV, ácido propiónico (AM-BV-P)

Para el Testigo, se prepararon 5 cajitas con la la dieta y los coleópteros, y para el resto de tratamientos se utilizaron 15 cajitas.

Para hacer los tratamientos se utilizaron desecadores de cristal de 200 mm de diámetro y 7000 mL de volumen (Figura 2.1, Capítulo 2). En cada desecador se pusieron tres cajitas con la dieta y los coleópteros, es decir, que por cada tratamiento se prepararon 5 desecadores.

En cuanto a los tratamientos en AM, cuando los desecadores estaban preparados y tapados, se procedió a introducir la mezcla de gases siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2 del Capítulo 2. En el caso de los tratamientos AM-BV, previamente a introducir la mezcla de gases en los desecadores, en la parte interior de la tapa de cada desecador se puso un círculo de papel de filtro enroscado (Whatman® n° 1) de 9 cm de diámetro (Figura 3.2). Después, se tapó el desecador y, a continuación, se introdujo la mezcla de gases. Por último, el orificio por el que se introdujo el gas se cerró con un tapón con septum, a través del cual se analizó la concentración de CO_2 y O_2 con el analizador de gases, para verificar que la mezcla de gases era la correcta. A continuación, el BV correspondiente se aplicó con jeringa en el círculo de papel de filtro, situado en la parte interior de la tapa del desecador, pinchando en el septum del tapón. Esto se realizaba inmediatamente después de haber introducido y analizado la AM del interior del desecador.

En los tratamientos sin AM, se procedió de la misma manera que en los tratamientos con AM, pero sin aplicar la mezcla de gases.

Se escogieron concentraciones de BV inferiores a las necesarias para conseguir el 100% de mortalidad de los adultos de *S. oryzae*, según el estudio de López y Pascual-Villalobos (2008). Ninguno de los BV se diluyó. Así, del BV S-(+)-carvona se aplicaron 2,74 mg/L, 5,48 mg/L y 10,97 mg/L durante 24, 48 y 72 h, respectivamente. En cuanto a las concentraciones de linalol aplicadas, éstas fueron: 9,94 mg/L, 14,91 mg/L y 29,82 mg/L durante 24, 48 y 72 h, respectivamente. Y, de ácido propiónico, las concentraciones aplicadas fueron 2,82 mg/L, 5,65 mg/L y 33,94 mg/L durante 24, 48 y 72 h, respectivamente.

Después de haber preparado los desecadores de todos los tratamientos, éstos se pusieron en la cámara de condiciones ambientales controladas junto con las cajitas del tratamiento Testigo, durante el tiempo de exposición correspondiente (24, 48 o 72 h). Transcurridos estos periodos, y antes de abrir los desecadores, con el analizador de gases se procedió a analizar la concentración de CO₂ y O₂. Después, los desecadores se abrieron para airearlos y las cajitas se volvieron a poner en la cámara climática en las mismas condiciones ambientales, durante 24 h más. Pasado este tiempo, se contó el número de adultos vivos y muertos del coleóptero.

Se calculó el porcentaje de mortalidad respecto al número inicial de adultos colocados en cada cajita. La mortalidad natural de los adultos se calculó con las repeticiones del tratamiento Testigo.

3.3. Análisis de resultados

Los resultados obtenidos fueron tratados estadísticamente con el paquete estadístico JMP® 10.0.2 (SAS Institute, 2012).

En los tratamientos con AM se calcularon las medias (\pm error estándar) de los análisis de CO₂ y O₂, al inicio y al final de cada uno de ellos. Mediante el test de Bartlett's se comprobó la homogeneidad de las varianzas. Los resultados que lo requerían se transformaban mediante el arcoseno ($\sqrt{x/100}$). Por cada concentración de BV aplicado y tiempo de tratamiento, se realizó un ANOVA de una vía, para comprobar si existían diferencias significativas entre los tratamientos. En caso de detectarlas, se realizó un test de Tukey Multiple Range para comparar las medias.

4. Resultados

4.1. Evolución de la concentración de oxígeno y dióxido de carbono

En las Tablas 3.1, 3.2 y 3.3 se muestran los resultados de la concentración de los gases al inicio y al final del tratamiento (24, 48 o 72 h), en el interior de los desecadores con AMs.



Figura 3.2: Detalle de la tapa del desecador con el papel de filtro enroscado, en el que se dosificaban los μ L de BV correspondientes.

Respecto a los tratamientos con S-(+)-carvona, en el ensayo con AM, se observó que la concentración final de CO₂ se mantuvo con respecto a la inicial. En este mismo ensayo, a 24 y 48 h la concentración de este gas disminuyó significativamente con respecto a la concentración inicial ($F= 14,02$; g. l. = 3, 27; $P<0,01$) (Tabla 3.1). Sin embargo, la concentración de O₂ se mantuvo invariable a lo largo de los distintos periodos de tratamiento ($F= 2,98$; g. l. = 3, 27; $P= 0,05$) (Tabla 3.1). En los desecadores con AM-BV-C, tanto la concentración de CO₂ como la de O₂, no presentaron diferencias significativas respecto a las concentraciones iniciales, para los distintos tiempos de tratamiento (en CO₂: $F= 0,11$; g. l. = 3, 29; $P=0,94$) (en O₂: $F= 0,12$; g. l. = 3, 29; $P=0,94$) (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Concentraciones de CO₂ (%) y O₂ (%) (media ± error estándar) en el interior de los desecadores que contenían las muestras de los tratamientos AM y AM-BV-C (S-(+)-carvona). Las concentraciones de S-(+)-carvona fueron: 2,74 mg/L, 5,48 mg/L y 10,97 mg/L, para los tiempos de tratamiento de 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente.

Tiempo tratamiento (h)	TRATAMIENTO			
	AM		AM-BV-C	
	[CO ₂] (%)	[O ₂] (%)	[CO ₂] (%)	[O ₂] (%)
0	48,69 ± 0,30 a	0,15 ± 0,03	48,54 ± 0,56	0,16 ± 0,04
24	45,16 ± 0,61 b	0,88 ± 0,31	46,94 ± 0,08	0,16 ± 0,04
48	46,10 ± 0,69 b	0,48 ± 0,38	46,76 ± 0,87	0,5 ± 0,28
72	47,57 ± 0,18 a	0,08 ± 0,03	44,62 ± 0,48	0,38 ± 0,19

Las medias de cada columna seguidas de una misma letra o sin letra, no son significativamente diferentes entre ellas ($P>0,05$, test Tukey, $n= 5$).

En los ensayos con el aceite esencial de linalol, la concentración de CO₂ del tratamiento con AM se mantuvo sin variación significativa a lo largo de los distintos tiempos de tratamiento, con respecto a la concentración inicial (Tabla 3.2). El porcentaje de O₂ del ensayo con AM presentó valores no significativos en los tiempos de tratamiento de 48 y 72 h, pero en el de 24 h disminuyó significativamente un 0,27% ($F= 6,03$; g. l.= 3, 17; $P<0,01$) (Tabla 3.2). La concentración de CO₂ del tratamiento AM-BV-L, se mantuvo constante con respecto a la concentración inicial, en los tratamientos a 24 y 72 h. Sin embargo, a 48 h aumentó un 3,26% ($F= 6,52$; g. l.= 3, 28; $P<0,01$). El nivel de O₂ disminuyó significativamente en todos los tiempos de tratamiento ($F= 25,12$; g. l.= 3, 29; $P<0,001$) (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Concentraciones de CO₂ (%) y O₂ (%) (media ± error estándar) en el interior de los desecadores que contenían las muestras de los tratamientos AM y AM-BV-L (linalol). Las concentraciones de linalol fueron: 9,94 mg/L, 14,91 mg/L y 29,82 mg/L, para los tiempos de tratamiento de 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente.

Tiempo tratamiento (h)	TRATAMIENTO			
	AM		AM-BV-L	
	[CO ₂] (%)	[O ₂] (%)	[CO ₂] (%)	[O ₂] (%)
0	53,57 ± 0,35 ab	0,43 ± 0,05 a	52,39 ± 0,36 b	0,49 ± 0,03 a
24	54,80 ± 0,55 a	0,16 ± 0,02 b	53,34 ± 0,97 ab	0,06 ± 0,02 b
48	55,20 ± 0,50 a	0,20 ± 0,00 ab	55,65 ± 0,20 a	0,10 ± 0,04 b
72	51,75 ± 0,25 b	0,25 ± 0,40 ab	51,98 ± 0,40 b	0,08 ± 0,02 b

Las medias de cada columna seguidas de una misma letra no son significativamente diferentes entre ellas ($P>0,05$, test Tukey, $n= 5$).

En los ensayos con el BV ácido propiónico, la concentración de CO₂ en el tratamiento AM se mantuvo en todos los tiempos de exposición, con respecto a la concentración inicial ($F=2,46$; g. l.= 3, 23; $P=0,09$) (Tabla 3.3). El porcentaje de O₂ en el tiempo de tratamiento de 72 h se mostró invariable, respecto a la concentración inicial. Sin embargo, a los tiempos de tratamiento de 24 y 48 h la concentración de O₂ disminuyó significativamente ($F=14,20$; g. l. = 3, 23; $P<0,001$) (Tabla 3.3). Respecto a la concentración de CO₂, de los ensayos AM-BV-P, no se observaron diferencias significativas entre el inicio y los diferentes periodos de tratamiento ($F=1,70$; g. l.= 3, 29; $P=0,19$). En cambio, el porcentaje de O₂ fue distinto en todos los tiempos de tratamiento, con respecto a la concentración inicial ($F=11,63$; g. l.= 3, 29; $P<0,001$) (Tabla 3.3).

Tabla 3.3: Concentraciones de CO₂ (%) y O₂ (%) (media ± error estándar) en el interior de los desecadores que contenían las muestras de los tratamientos AM y AM-BV-P (ácido propiónico). Las concentraciones de ácido propiónico fueron: 2,82 mg/L, 5,65 mg/L y 33,94 mg/L, para los tiempos de tratamiento de 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente.

Tiempo tratamiento (h)	TRATAMIENTO			
	AM		AM-BV-P	
	[CO ₂] (%)	[O ₂] (%)	[CO ₂] (%)	[O ₂] (%)
0	53,53 ± 0,31	0,49 ± 0,04 a	52,86 ± 0,55	0,40 ± 0,04 a
24	53,04 ± 0,48	0,12 ± 0,02 b	52,84 ± 0,32	0,08 ± 0,03 b
48	52,56 ± 0,28	0,24 ± 0,04 b	51,02 ± 0,20	0,10 ± 0,03 b
72	51,75 ± 0,25	0,25 ± 0,05 ab	52,46 ± 0,28	0,20 ± 0,03 b

Las medias de cada columna seguidas de la misma letra o sin letra, no son significativamente diferentes entre ellas ($P>0,05$, test Tukey, $n=5$).

4.2. Evaluación de la combinación de atmósferas modificadas con bioactivos volátiles sobre la mortalidad de *Sitophilus oryzae*

En la Figura 3.3 se muestran los resultados obtenidos de la mortalidad de los adultos de *S. oryzae* al ser tratados con AMs, con S-(+)-carvona o con la combinación de AMs y el bioactivo, durante 24, 48 o 72 h.

Se observó un efecto positivo al combinar el tratamiento con CO₂ y el bioactivo, ya que la mortalidad incrementó significativamente, con respecto al tratamiento con AM o con el bioactivo por separado, tanto en el tratamiento a 24 h ($F=21,28$; g. l. = 2, 44; $P<0,001$), como en el de 48 h ($F=120,89$; g. l. = 2, 44; $P<0,001$), y en el de 72 h ($F=623,96$; g. l. = 2, 44; $P<0,001$) (Figura 3.3 A, B y C). En el tratamiento con AM a 24 h, la mortalidad fue de 1,48%, en el de 48 h fue de 36,97% y en el de 72 h, de 66,70% (Figura 3.3 A, B y C). Cuando la S-(+)-carvona se aplicó sola, las mortalidades fueron prácticamente nulas en los tres tiempos de tratamiento (Figura 3.3 A, B y C).

La mortalidad de los adultos de *S. oryzae* obtenida después de ser tratados en AMs, con el BV linalol o con la mezcla de AMs y el BV linalol, se muestran en la Figura 3.4.

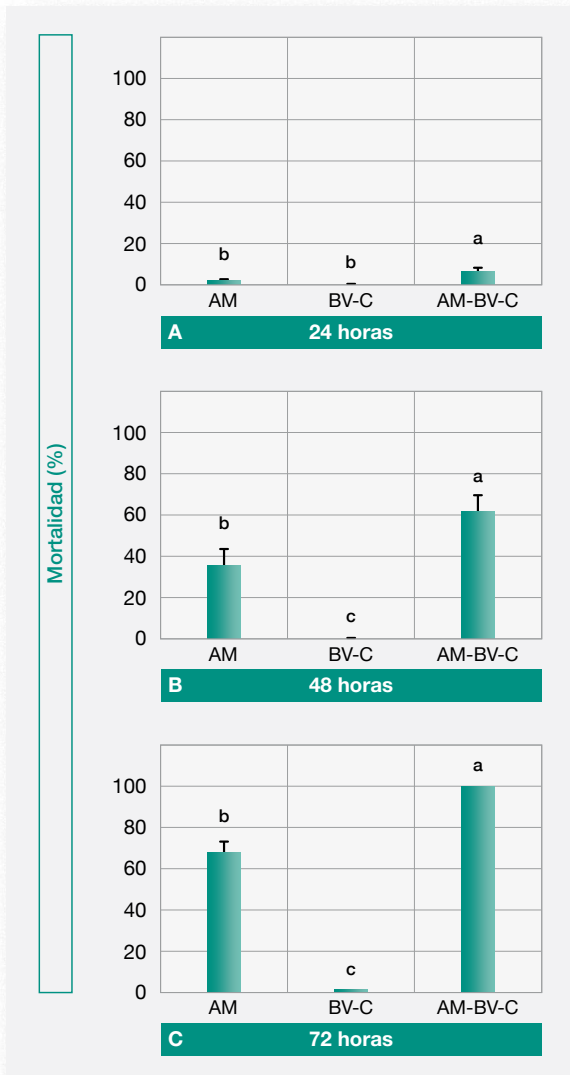


Figura 3.3: Porcentaje de mortalidad (media ± error estándar) de adultos de *S. oryzae* tratados en AMs con 48,69% CO₂ / 0,15 % O₂ (AM) y el bioactivo volátil S-(+)-carvona (BV-C) solo o combinado con AM (AM-BV-C) durante 24 h (A), 48 h (B) y 72 h (C). Las concentraciones de S-(+)-carvona fueron: 2,74 mg/L, 5,48 mg/L y 10,97 mg/L, para los tiempos de tratamiento de 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente. Las medias con una misma letra no son significativamente diferentes entre ellas, para un mismo tiempo de exposición ($P > 0,05$, test Tukey, $n = 5$).

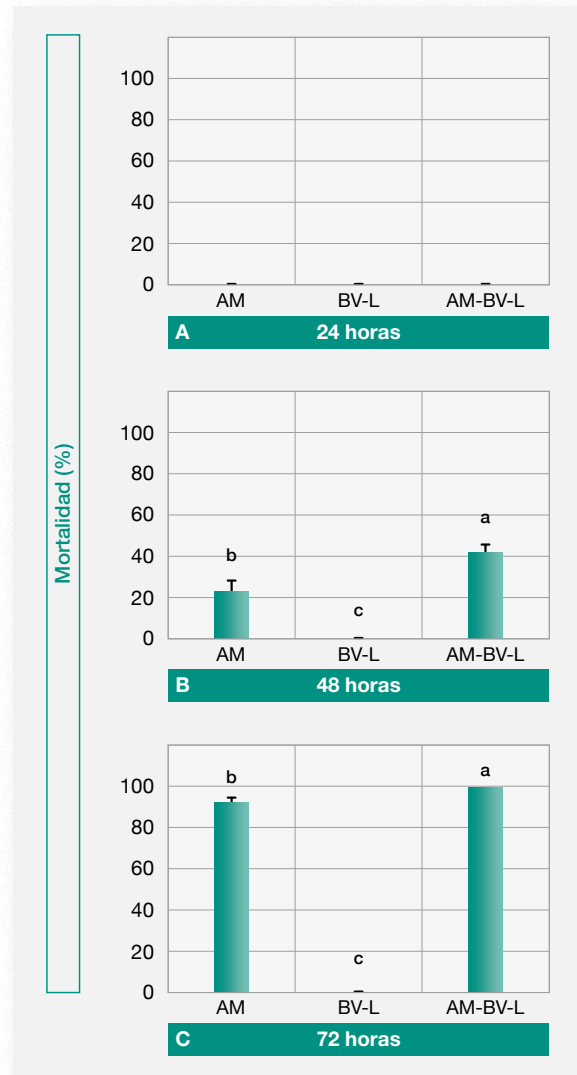


Figura 3.4: Porcentaje de mortalidad (media ± error estándar) de adultos de *S. oryzae* tratados en AMs con 53,57% CO₂ / 0,43 % O₂ (AM) y el bioactivo volátil linalol (BV-L) solo o combinado con AM (AM-BV-L) durante 24 h (A), 48 h (B) y 72 h (C). Las concentraciones de linalol fueron: 9,94 mg/L, 14,91 mg/L y 29,82 mg/L, para los tiempos de tratamiento de 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente. Las medias con una misma letra o sin letra, no son significativamente diferentes entre ellas, para un mismo tiempo de exposición ($P > 0,05$, test Tukey, $n = 5$).

En el tratamiento a 24 h (Figura 3.4 A) se observó que la mortalidad en los tres tratamientos (AM, BV-L y AM-BV-L) fue, prácticamente, nula. A 48 h, la mortalidad obtenida en el tratamiento AM fue próxima al 22% (Figura 3.4 B). En cuanto al tratamiento con linalol, solamente, la mortalidad de los adultos de *S. oryzae* fue prácticamente nula (Figura 3.4 B). No obstante, se observó un fuerte incremento de la mortalidad cuando se combinaron los tratamientos con AMs y el bioactivo linalol, aumentando la mortalidad significativamente, con respecto al tratamiento con AMs, hasta un valor ligeramente superior al 40% ($F = 130,43$; g. l. = 2, 35; $P < 0,001$) (Figura 3.4 B). A 72 h, la mortalidad de los insectos fue del 92%, en el tratamiento AM (Figura 3.4 C). El tratamiento BV-L, realizado con la dosis de linalol de 29,82 mg/L, provocó una mortalidad del insecto muy baja, alrededor de un 1%. En cambio, se observó un efecto positivo al combinar los tratamientos con AMs y el BV. La mortalidad aumentó significativamente,

con respecto a los tratamientos con AMs o con linalol, solamente, hasta un valor de 99% ($F=1389,37$; g. l.= 2, 35; $P<0,001$). (Figura 3.4 C).

Los resultados de la mortalidad de los adultos de *S. oryzae* al ser tratados en AMs, con el BV ácido propiónico o con la combinación de las AMs y el BV, se muestran en la Figura 3.5.

Se observó que en los tratamientos a 24 h, la mortalidad fue inferior al 10% en los tres tratamientos (Figura 3.5 A). A 48 h, se observó una mortalidad de alrededor de un 40% en el tratamiento con AM, y en el tratamiento con una concentración de 5,65 mg/L de ácido propiónico, la mortalidad de los insectos fue muy baja (1%) (Figura 3.5 B). Sin embargo, se observó que la mortalidad del tratamiento en el que se combinaron la AM y el ácido propiónico, fue ligeramente superior a la del tratamiento con AM, pero no fue significativamente diferente ($F=126,55$; g. l.= 2, 44; $P<0,001$) (Figura 3.5 B). A 72 h, la mortalidad obtenida en el tratamiento con AM fue de un 92% (Figura 3.5 C), mientras que en las muestras con el BV solamente, se consiguió una mortalidad del 0,4%. Cuando se combinaron los dos tratamientos (AM-BV-P), la mortalidad aumentó significativamente, con respecto a los dos tratamientos por separado, hasta un valor de 99% ($F=1688,23$; g. l.= 2, 35; $P<0,001$) (Figura 3.5C).

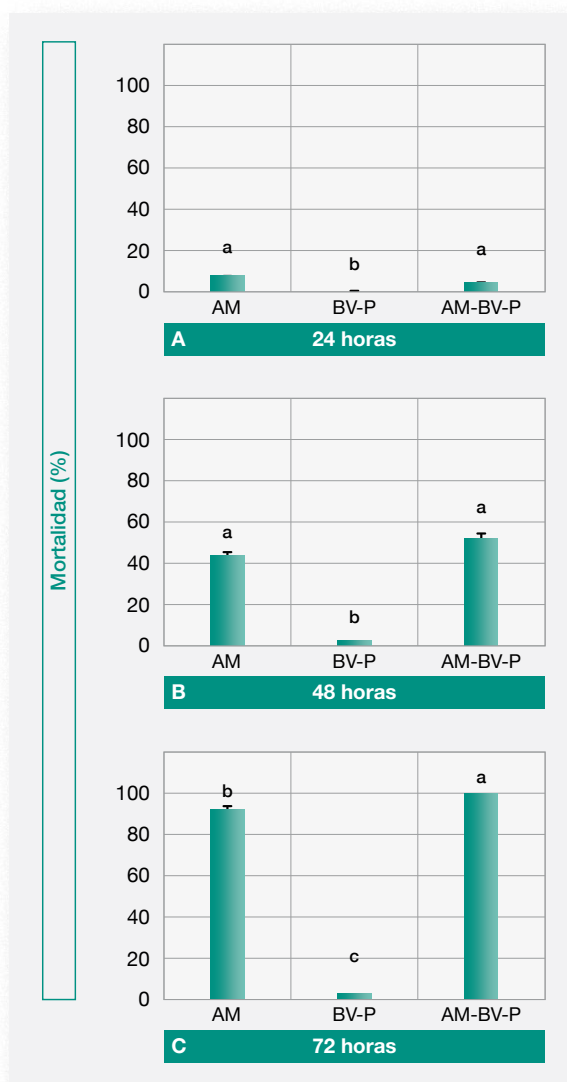


Figura 3.5: Porcentaje de mortalidad (media \pm error estándar) de adultos de *S. oryzae* tratados en AMs con 53,53% CO_2 / 0,49 % O_2 (AM) y el bioactivo volátil ácido propiónico (BV-P) solo o combinado con AM (AM-BV-L) durante 24 h (A), 48 h (B) y 72 h (C). Las concentraciones de ácido propiónico fueron: 2,82 mg/L, 5,65 mg/L y 33,94 mg/L, para los tiempos de tratamiento de 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente. Las medias con una misma letra no son significativamente diferentes entre ellas, para un mismo tiempo de exposición ($P>0,05$, test Tukey, $n=5$).

5. Discusión

En los desecadores AM, la concentración de CO_2 se mantuvo constante en los tres periodos de tiempo ensayados, excepto en los tratamientos con S-(+)-carvona, a 24 y 48 h (Tabla 3.1). Los valores de la concentración de CO_2 en estos tiempos de exposición fueron significativamente distintos a la concentración inicial. Esto podría haber sido debido a la disolución del CO_2 en las grasas y humedad del arroz e insectos. No obstante, al observarse sólo en este caso, y no

en los tratamientos de AM, de los tratamientos con linalol y ácido propiónico, esta diferencia se podría atribuir a la variabilidad de las muestras.

En los ensayos AM-BV, la concentración de CO₂ en el interior de los desecadores, también se mantuvo constante en todos los tratamientos, con respecto a la concentración inicial de este gas, excepto en el de 48 h con el BV linalol (AM-BV-L) (Tabla 3.2). Esta diferencia se atribuyó a la variabilidad de las muestras.

Las diferencias observadas en la concentración de O₂, con respecto a la concentración inicial de este gas, en algunos tratamientos se debe, probablemente, al consumo de este gas por parte de los insectos (Tablas 3.1, 3.2 y 3.3). Sin embargo, los valores de la reducción de O₂ obtenidos oscilaron entre 0,2% y 0,43%. Por lo tanto, estas variaciones no se consideraron relevantes.

Tal y como se esperaba, la mortalidad obtenida en los tratamientos con AM, en ningún caso fue del 100% ya que, el tiempo necesario para conseguir este nivel de mortalidad de los adultos de *S. oryzae* tratados con AMs con la mezcla de gases 50% CO₂/ 3% O₂ / 47% N₂, y en las mismas condiciones ambientales que el presente estudio, es de 96 h (Riudavets *et al.*, 2009).

En los diferentes tiempos de tratamiento realizados con el BV S-(+)-carvona, sin AM, se apreciaron mortalidades del coleóptero muy bajas (Figura 3.3). Por ejemplo, cuando se aplicó una concentración de S-(+)-carvona de 10,97 mg/L durante 72 h se obtuvo una mortalidad del coleóptero de 0,53% (Figura 3.3 C). López y Pascual-Villalobos (2008) observaron que, aplicando una concentración de 6,40 mg/L de este BV durante 24 h, a 30 °C y 51% de HR, se conseguía un 70% de mortalidad de los adultos de *S. oryzae*. Lee *et al.* (2003) demostraron que un tratamiento con una concentración de S-(+)-carvona de 50 mg/L sobre adultos de *S. oryzae* durante 14 h, provocaba una mortalidad del coleóptero del 10%. La diferencia observada entre los resultados del presente estudio y los de estos autores, podría deberse a que en las muestras de esta tesis había presencia de arroz integral (50 g), mientras que en las del estudio de López y Pascual-Villalobos (2008) no había dieta y, en el trabajo de Lee *et al.* (2003) había una cantidad muy baja de dieta (no especificada). Además, el tratamiento del estudio de López y Pascual-Villalobos (2008) se realizó a una temperatura superior y a una HR inferior a las de los tratamientos del presente trabajo.

Se han realizado estudios, en los que se demuestra que la presencia de dieta disminuye el efecto insecticida del BV debido, principalmente, a la elevada adsorción del BV en la dieta (Lee *et al.*, 2003; Don-Pedro, 1996; Ketoh *et al.*, 2002). En tratamientos con el BV pulegona sobre adultos de *T. castaneum*, se observó que al introducir maíz en las repeticiones, los valores de la LC₅₀ a 24 h aumentaban, con respecto a las que no tenían maíz (Lee *et al.*, 2003). Por ejemplo, cuando se hizo un tratamiento de 96 h sobre los adultos de *T. castaneum* a 37 °C, los valores de la LC₅₀ en los tratamientos con la pulegona sola o con la pulegona en presencia de maíz fueron de 0,2 y 20,9 mg/L, respectivamente (Lee *et al.*, 2003). Estos autores atribuyen esta diferencia entre los resultados obtenidos, a la disminución de la difusión de los vapores del monoterprenoide debido a la presencia del maíz o, a la posibilidad de que la pulegona se hubiera adsorbido en el maíz. Estas causas habrían provocado la disminución de la disponibilidad del BV presente en las repeticiones que contenían maíz, en comparación con las que no había presencia de éste. Como consecuen-

cia, el BV habría afectado menos al insecto en las repeticiones en las que había presencia de los granos del cereal.

De igual modo, la presencia de granos de caupí en repeticiones con adultos de *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Chrysomelidae) provocó una disminución de la mortalidad de los insectos cuando éstos fueron tratados con aceite esencial de piel de lima, en comparación a la mortalidad obtenida en repeticiones sin presencia de judías (Don-pedro, 1996). Así, el valor de la LC_{50} para el tratamiento de *C. maculatus* durante 24 h, en presencia de 160 g de caupí, aumentó 4 veces con respecto al mismo tratamiento pero sin la presencia de las judías (Don-pedro, 1996). Este hecho fue debido a que, parte del aceite esencial de piel de lima se adsorbió en las judías, lo que provocó una disminución de la cantidad de vapor del aceite en estas repeticiones, y ello implicó la necesidad de tiempos de exposición al BV más largos, para conseguir la toxicidad necesaria para el control del insecto (Don-pedro, 1996). Ketoh *et al.* (2002), en su estudio también demostraron que, probablemente, se produjo adsorción de los aceites esenciales de *Cymbopogon nardus* L., *C. schoenanthus* L. y *Ocimum basilicum* L. en semillas de caupí, ya que la mortalidad de los adultos de *C. maculatus* al ser tratados con los aceites esenciales en presencia de las judías, disminuyó en comparación a si no había presencia de éstas.

Por otra parte, el efecto de la temperatura podría haber influido en la efectividad del BV sobre la mortalidad del insecto. Lee *et al.* (2003) en su estudio demostraron que al incrementar la temperatura de 24 °C a 37 °C en tratamientos sobre adultos de *T. castaneum* con el BV pulegona durante 48 h, la LC_{50} disminuyó 4,8 veces. Sin embargo en el estudio realizado por Papachristos y Stamopoulos (2002), se demostró que las larvas y las pupas de *A. obtectus* eran más sensibles a los tratamientos con los aceites esenciales de *Lavandula hybrida* Rev. (Labiatae), *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) y *Eucalyptus globulus* Labill. (Myrtaceae) a 10 °C y 18 °C, que a 4 °C, 26 °C, 32 °C y 36 °C. Estos autores indicaron que podría haber varios factores que influirían en la relación entre la temperatura y la efectividad del BV. Entre estos factores, se encontrarían la velocidad de evaporación del BV, el nivel de sorción y la velocidad de desarrollo del insecto. Además, al incrementar la temperatura, la movilidad del insecto incrementa (Fargo *et al.*, 1989), lo que provoca un mayor contacto del insecto con los vapores del BV. Por otra parte, la HR a la que se hicieron los tratamientos en el estudio de López y Pascual-Villalobos (2008) era alrededor de un 20% inferior a la del presente trabajo, lo cual podría haber favorecido el control del coleóptero. La HR mínima necesaria para desarrollo óptimo de *S. oryzae* es del 60% (Howe y Hardy, 1965), con lo cual en el estudio de López y Pascual-Villalobos (2008) se estaría trabajando un 9% por debajo de la HR óptima. Esta HR también habría favorecido la mortalidad de los insectos. En el estudio de Vassilakos y Athanassiou (2013), en el cual se estudió la influencia de la temperatura y la HR en la eficacia de spinetoram sobre adultos de *S. oryzae*, en general, se observaron valores de mortalidad más elevados cuando los adultos eran tratados a 30 °C y 55% HR, que a 25 °C y 75% HR, en presencia de trigo, tratándolos a distintas concentraciones de spinetoram y diferentes tiempos de tratamiento.

La mortalidad de los adultos de *S. oryzae* también fue muy baja cuando los insectos se trataron con el monoterpenoide linalol (Figura 3.4). En los tres tiempos de tratamiento, ésta fue inferior al 1%. López y Pascual-Villalobos (2008) demostraron que la LD_{95} para *S. oryzae* durante 24 h era de 214,87 mg/L, trabajando a 30 °C y 51% HR. En el presente estudio, la concentración

probada a 24 h fue de 9,94 mg/L, muy inferior a la LD₉₅ obtenida por López y Pascual-Villalobos (2008). Además, en su trabajo estos autores, cuando trataron a los insectos con linalol a una concentración de 5,75 mg/L, obtuvieron una mortalidad de los adultos de *S. oryzae* del 70%. La diferencia obtenida entre los resultados del presente trabajo y los de estos autores, podría ser por las causas expuestas anteriormente en el caso de la S-(+)-carovona. En un estudio realizado por Lee *et al.* (2003), se observó que la mortalidad de adultos de *S. oryzae* fue del 0%, cuando éstos fueron tratados con linalol a una concentración de 50 mg/L durante 14 h y a unas condiciones ambientales de 25 ± 1 °C y 40-60% de HR. Aunque en las repeticiones de este estudio no había dieta, el tiempo de tratamiento fue inferior al del presente trabajo y al de López y Pascual-Villalobos (2008). Además, la temperatura a la que se realizó el tratamiento era igual que la del presente trabajo, es decir, 5 °C inferior a la de López y Pascual-Villalobos (2008), por lo que el tiempo de tratamiento y las condiciones ambientales del estudio de Lee *et al.* (2003) habrían impedido el efecto tóxico del linalol sobre el insecto.

La mortalidad obtenida con el BV ácido propiónico también fue muy baja (≤1%) en los tres tiempos de tratamiento y concentraciones del BV (Figura 3.5). En el estudio de Germinara *et al.* (2007) se determinó que la LC₉₅ sobre adultos de *S. oryzae* a 24 h y a una temperatura de 23 °C, era de 11,9 mg/L. En el presente trabajo, la concentración más alta de ácido propiónico, se aplicó en el tratamiento a 72 h y ésta era superior a la del estudio de Germinara *et al.* (2007). Sin embargo la mortalidad obtenida fue de sólo 0,40%. La diferencia observada entre los resultados del presente trabajo y los de Germinara *et al.* (2007), la podríamos atribuir a que en las repeticiones de su estudio no había dieta en las repeticiones. Entonces, la disponibilidad del BV a lo largo del tiempo de tratamiento habría disminuido menos en el estudio de Germinara *et al.* (2007) que en el del presente estudio, ya que, en las muestras de la tesis, parte del BV posiblemente se adsorbió en la dieta.

En los tratamientos a 3 días, en los que se combinaron los BV con la AM, se produjo un efecto positivo, incrementando la mortalidad del coleóptero significativamente, con respecto a los tratamientos con AM o BV, solamente (Figuras 3.3, 3.4 y 3.5). Concretamente, en estos tratamientos se consiguió un porcentaje de mortalidad del coleóptero próxima al 100%. El CO₂, probablemente, facilitó la penetración del BV a través de los espiráculos, ya que, la apertura de éstos es uno de los principales efectos del CO₂ sobre los insectos (Nicolas y Sillans, 1989) y, de esta manera, el efecto conjunto del BV y del CO₂, produjo un incremento de la mortalidad de los adultos de *S. oryzae*. Por otra parte, varios estudios indican que la mortalidad de los insectos causada por los monoterpenoides es debida a que éstos inhiben la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Houghton *et al.* 2006). Sin embargo, en un estudio realizado por Kostyukovsky *et al.* (2002a) sobre insectos, se observó que aparte de inhibir esta enzima, los aceites esenciales SEM76 y ZP51 incrementaban los niveles de Adenosín monofosfato (AMP) cíclico, indicando una posible activación de la octopamina. Lee *et al.* (2001) tampoco observaron una correlación directa entre la toxicidad de varios monoterpenoides, con la inhibición de la AChE en insectos. Lee *et al.* (2001) y Ketoh *et al.* (2002) indicaron que, aparte de inhibir la AChE, los monoterpenoides es probable que actúen también, sobre otras zonas vulnerables del insecto, como por ejemplo el citrocromo P450, catalizador de la reacción de las monooxigenasas. Işikber (2010) en su estudio, también observó un efecto sinérgico al combinar CO₂, a una concentración del 92%, con aceite esencial de ajo (*Allium sativum* L.) durante 24 h, sobre adultos y pupas de *T. confusum* y *E. kuehniella*. En el tratamiento sobre

adultos de *T. confusum*, la adición del 92% de CO₂ a 10 µL/L del aceite esencial de ajo incrementó la mortalidad 5,6 veces, con respecto al tratamiento con sólo el aceite esencial de ajo, y 4,2 veces, con respecto al tratamiento con la AM. De esta manera, la LC₉₀ para este insecto y estado de desarrollo a 24 h pasó de ser, con el aceite esencial solamente, de 30,07 µL/L a 6,12 µL/L con el aceite esencial y el CO₂ (Işikber, 2010). En un estudio realizado por Wang *et al.* (2001), se observó un incremento de la mortalidad de *L. bostrichophila* de un 47,3 ± 2,1 % a un 100% cuando se aplicaron 10 ppm de aceite esencial *Cupressus funebris* Endl. sólo, o combinado con una AM que contenía 15% CO₂ / 1% O₂ / 84% N₂, durante 24 h. Shaaya *et al.* (1999 a) también observaron un incremento de la mortalidad de 34% y 30% de adultos de *T. castaneum* y *R. domonica*, respectivamente, cuando aplicaron un tratamiento en el que combinaban 70 µL/L del aceite esencial SEM76 con un 15% de CO₂, en comparación con la aplicación del aceite esencial solo, a la misma concentración.

6. Conclusiones

1. El tratamiento de los adultos de *S. oryzae* con los bioactivos volátiles, en cualquiera de las dosis estudiadas, no controla la plaga.
2. La atmósfera modificada con un contenido de CO₂ del 50% produce una mortalidad de los gorgojos inferior al 92%, con un máximo de 3 días de tratamiento.
3. La combinación de la atmósfera modificada con los bioactivos estudiados, S-(+)-carvona, linalol o ácido propiónico, permite alcanzar una mortalidad de los adultos de *S. oryzae* del 99%, después de 3 días de tratamiento. Dosis inferiores de los bioactivos volátiles (tiempos inferiores y concentraciones inferiores) en el tratamiento conjunto, no muestra este grado de control sobre la plaga.

CAPÍTULO 4

Aplicación de atmósferas modificadas para evitar la producción de micotoxinas por parte del hongo *Aspergillus flavus* Link y favorecidas por la presencia de *Sitophilus zeamais* Motschulsky en maíz almacenado



1. Introducción

De entre todos los cereales, la producción de maíz a nivel mundial fue la más elevada en el año 2012 (FAO, 2014). Su producción representó el 34,1% del total de los cereales. A nivel de la Unión Europea, en el año 2012 se cultivaron unos 9 millones de hectáreas de maíz, y su producción representó un 6,5% respecto a la producción mundial de este cereal (FAO, 2014).

Una vez el cereal ha sido recolectado, es de vital importancia realizar su almacenamiento de forma adecuada para evitar alteraciones químicas, físicas y/o biológicas en el grano. Como consecuencia de estas alteraciones podrían producirse pérdidas cuantitativas, cualitativas, nutricionales, germinativas y económicas del maíz. Si algún o algunos de los factores abióticos del ecosistema del grano de cereal no fuera óptimo para la conservación de éste, podría favorecerse la presencia de insectos, ácaros y microorganismos en él (Navarro y Noyes, 2002). Entre estos microorganismos, podrían desarrollarse hongos productores de micotoxinas (Magan *et al.*, 2003).

Una de las principales plagas del maíz almacenado es el coleóptero *S. zeamais* (Adarkwah *et al.*, 2012; Lamboni y Hell, 2009). La presencia de estos insectos provoca roturas en el grano de maíz favoreciendo, de esta manera, la proliferación de hongos toxigénicos (Dowd, 1998). En cuanto a los microorganismos, en el maíz almacenado podrían desarrollarse hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Estos hongos pueden producir micotoxinas, y causar toxi-infecciones alimentarias graves. Por ejemplo, *A. flavus* produce la micotoxina AFB1, que está clasificada dentro del grupo 1 (cancerígena para humanos) de carcinógenos, por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2012).

El control de *S. zeamais* se ha basado, a lo largo de los años en la aplicación continuada de insecticidas residuales de contacto y fumigantes (Adarkwah *et al.*, 2012). Sin embargo, el número de materias activas registradas y el LMRs permitidos en el producto final son muy bajos actualmente (Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, 2014) y, como consecuencia, surge la necesidad de encontrar alternativas, dentro del marco del CIP que sean respetuosas con el medio ambiente.

Como ya se ha mencionado anteriormente en esta tesis, un método alternativo a la aplicación de productos químicos en alimentos almacenados, es el uso de AMs con un alto contenido de CO₂ (Navarro, 2006). El principal efecto que ejerce el CO₂ sobre los insectos es que les produce la apertura de los espiráculos, los cuales regulan su respiración (Nicolas y Sillans, 1989). Como consecuencia, hay una importante pérdida de agua y el insecto se deseca hasta morir. Además, si la humedad del ambiente es baja, el efecto del CO₂ sobre el insecto se verá favorecido. El CO₂ también produce acidificación de los fluidos internos del insecto, modificaciones de diferentes rutas metabólicas, efecto anestésico y reducción de la actividad de los músculos alares, debido a la alteración de la permeabilidad de las membranas celulares de las neuronas. (Nicolas y Sillans, 1989).

En cuanto al efecto de las AMs sobre los hongos, hay diversos estudios que indican que las concentraciones altas de CO₂ pueden disminuir el crecimiento de los hongos. Paster (1990) concluyó que la producción de aflatoxina por *A. flavus* es un proceso aeróbico, el cual puede bloquearse cuando se incrementan los niveles de CO₂, y puede llegar a inhibirse a bajas concentraciones de O₂. Zardetto (2005) y Taniwaki *et al.* (2009) observaron que AMs con un porcentaje de CO₂ superior al 40% pueden reducir el crecimiento de hongos y, por consiguiente, la producción de micotoxinas. Giorni *et al.* (2008) observaron que una atmósfera con un 50% de CO₂ aplicada a un cultivo del hongo *A. flavus* en maíz, inhibe totalmente la producción de aflatoxina. Taniwaki *et al.* (2010) observaron una disminución de la velocidad de crecimiento de *A. flavus*, cuando éste era sometido a AMs con un 80% de CO₂ y un 20% de O₂. También detectaron que, bajo estas condiciones, se inhibía totalmente la producción de aflatoxina.

La aplicación de tratamientos con AMs con una alta concentración de CO₂ en el maíz almacenado, para impedir el desarrollo de insectos, podría a la vez, evitar la presencia de micotoxinas producidas por hongos, cuya proliferación se ve favorecida por la actividad de los insectos en el grano de cereal.

2. Objetivos

Determinar, en condiciones de laboratorio, si los daños en el grano de maíz que produce el coleóptero *S. zeamais* podían favorecer la producción de micotoxinas por parte del hongo *A. flavus* y, si esta producción se vió afectada por el contenido de humedad inicial del grano.

Evaluar el efecto del tratamiento con atmósferas modificadas con alta concentración de CO₂ sobre la producción de micotoxinas en los granos de maíz almacenados.

3. Material y métodos

Para la realización del estudio se empleó maíz en grano de la variedad DKC 6666 (Monsanto Company) que, previamente a la realización del ensayo, se mantuvo en unas condiciones ambientales de 25 ± 2 °C de temperatura y a 80 ± 5% de HR.

3.1. Cría de *Sitophilus zeamais* a escala de laboratorio

La dieta de la cría de *S. zeamais* era arroz integral de cultivo ecológico el cual, antes de ser utilizado para preparar la cría, se aclimatava procediendo de la misma manera que la descrita en el apartado 3.1 del Capítulo 1.

Previamente a la realización de los ensayos, y para aclimatar el coleóptero al nuevo sustrato, se cambió la dieta de arroz integral, a la de maíz de la variedad DKC 6666, durante 3 generaciones del insecto. Los adultos de *S. zeamais* utilizados en la realización de los ensayos, se obtuvieron de la cría que se mantiene en el laboratorio de Entomología del IRTA de Cabrils desde hace 5 años.

El maíz destinado a la cría, se mantuvo en las mismas condiciones ambientales que el arroz de la dieta, es decir a 25 ± 2 °C de temperatura y $70 \pm 10\%$ de HR. El contenido de humedad (ch) del maíz se medía con el equipo de análisis de humedad de granos digital WILE-55 (Farmcomp Agroelectronics) (Figura 4.1).

La metodología seguida para la obtención de los adultos del coleóptero fue la misma que la descrita en el apartado 3.2.1 del Capítulo 1, para la cría de *S. oryzae*.



Figura 4.1: Analizador digital de humedad de granos de cereales, WILE-55 (Farmcomp Agroelectronics).

3.2. Preparación de la suspensión de esporas de *Aspergillus flavus*

La cepa de *A. flavus* que se utilizó en los ensayos, provenía del Servicio de Bacteriología y Micología del Departamento de Sanidad y Anatomía Animales de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Para preparar la suspensión de *A. flavus* a una concentración de 10 000 esporas/mL, se pusieron 10 mL de agua destilada a 2 °C de temperatura en el vial que contenía el cultivo del hongo. A continuación, el vial con el agua se agitaba y cuando se observaba que las colonias se desprendían, se procedía a hacer el recuento de esporas, utilizando un hemacitómetro (cámara de Neubauer, BLAUBRAND®) (Figura 4.2). Para hacer el recuento, se depositaba 1 gota de la suspensión preparada en cada una de las dos cámaras de Neubauer del portaobjetos. Dependiendo de la concentración obtenida, se procedía a hacer una dilución, y se volvían a contar el número de esporas/mL de la suspensión diluida. Estas operaciones se repitieron hasta llegar a la concentración deseada (10 000 esporas/mL).

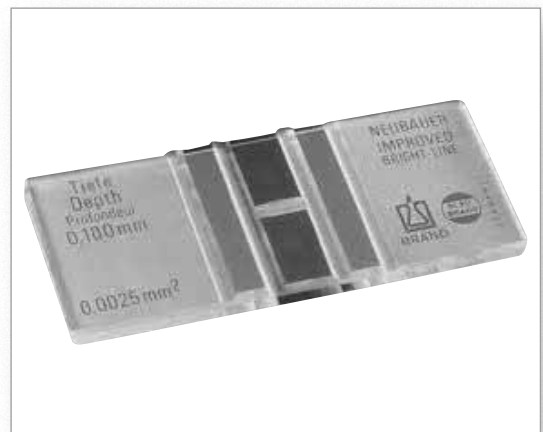


Figura 4.2: Cámara de Neubauer utilizada para determinar el número de esporas de *A. flavus* por unidad de volumen de líquido. Las esporas se cuentan con un microscopio.

3.3. Efecto de la presencia del gorgojo *Sitophilus zeamais* sobre la producción de micotoxinas de *Aspergillus flavus* en maíz (ensayo 1)

En este ensayo se utilizaron granos de maíz enteros con un ch inicial del 16% y granos de maíz molturados con un ch inicial del 18%. Este ensayo se realizó en unas condiciones ambientales de alta humedad relativa, concretamente del $80 \pm 10\%$.

Los tratamientos que se realizaron fueron los siguientes:

- Maíz en grano con un ch inicial del 16% (Maíz-16)
- Maíz en grano con un ch inicial del 16% y *A. flavus* (Maíz-16-AF)
- Maíz en grano con un ch inicial del 16% y *A. flavus* y *S. zeamais* (Maíz-16-AF- SZ)
- Maíz troceado mecánicamente con un ch inicial del 18% y *A. flavus* (MaízT-18-AF)

Para cada tratamiento se prepararon 5 repeticiones, en los correspondientes recipientes de cristal (Figura 1.5 B, Capítulo 1), con 150 g de maíz por repetición.

Para conseguir que el maíz tuviera el 16% de ch, los recipientes se pusieron dentro de cajas de plástico con tapa, de 35 cm x 40 cm x 55 cm (cada tratamiento en una caja) (Figura 4.3 A), que mantenían unas condiciones ambientales de 25 °C de temperatura y 80% de HR, durante un periodo mínimo de 15 días. Estas cajas estaban dentro de la cámara climática a 25 ± 2 °C y 70 ± 10 % de HR. Para alcanzar la HR del 80% en el interior de las cajas, en éstas se ubicó un recipiente con una solución de agua con glicerina con una a_w de 0.8.

Cuando el maíz alcanzó un ch del 16% se realizó la inoculación de *A. flavus* en una cámara de flujo laminar. En cada repetición se introdujeron 0,75 mL de la suspensión de *A. flavus* con una concentración de 10 000 esporas/mL (preparada según apartado 3.2), y se mezcló bien con el maíz, obteniendo una concentración de 50 esporas de *A. flavus*/g de maíz. A continuación, en el tratamiento que debía contener *S. zeamais*, se hizo la infestación con este coleóptero, poniendo 225 adultos/repetición.

Con el objetivo de obtener grano de maíz troceado, simulando el daño que produce el insecto al cereal, pero sin la presencia del coleóptero y con un ch del 18%, se fraccionaron mecánicamente los granos con un mortero, hasta conseguir que las porciones de maíz fueran de una medida aproximada de un cuarto de grano. Este maíz se utilizó en el tratamiento MaízT-18-AF. A continuación, se humedecieron con agua del grifo hasta conseguir un ch del 18%, que se midió con el analizador digital de humedad de granos de cereales WILE-55 (Farmcomp Agroelectronics) (Figura 4.1). Después, se pesaron 150 gramos del maíz molturado por cada repetición. A continuación, se añadieron las esporas de *A. flavus* procediendo de la misma manera que en el caso del maíz en grano.

Después, todos los recipientes con el maíz, el hongo y los insectos, se almacenaron en la cámara climática dentro de las cajas a 25 ± 2 °C de temperatura y a 80 ± 10 % de HR. La tapa de las cajas se abrió parcialmente, para evitar la acumulación de CO₂ que se pudiera generar. Semanalmente, se controlaba la humedad del interior de las cajas, para comprobar que ésta se mantenía alrededor del 80%. Si había alguna variación se ajustaba la a_w de la solución de agua con glicerina, añadiendo agua o glicerina. Para determinar la humedad y la temperatura del interior de estas cajas, se utilizó la sonda de humedad y temperatura de la marca comercial TESTO Data logger 454, y el análisis de la mezcla de gases en el interior de las cajas, se hizo a través de un agujero realizado en la tapa de cada caja (Figura 4.3 B), con el analizador de gases WITT OXYBABY 6.0.

Transcurridas 17 semanas desde el inicio del ensayo, se evaluó el número de adultos de *S. zeamais* de los tratamientos que se habían infestado, el recuento de las unidades formadoras

de colonias (ufc) de hongos y levaduras por gramo de maíz en todos los tratamientos (análisis realizado por el laboratorio Silliker Ibérica, S. A.) y la determinación del contenido de aflatoxinas (ppb) también en todos los tratamientos, con el kit Agraquant® (ver apartado 3.3.1).

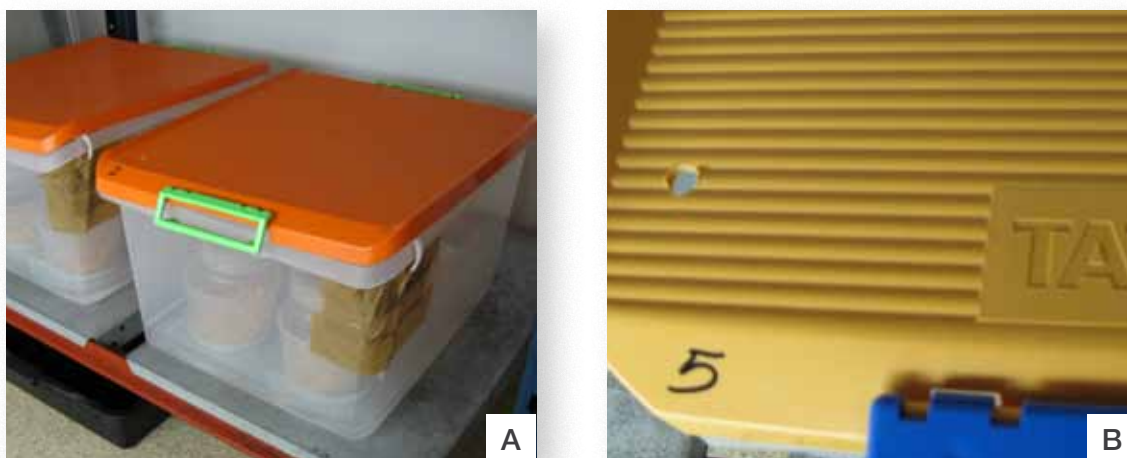


Figura 4.3: (A) Cajas utilizadas para mantener las repeticiones de los tratamientos a 25 ± 2 °C de temperatura y a $80 \pm 10\%$ de HR. (B) Detalle de la tapa de la caja, en la que se aprecia el agujero realizado para la determinación de las concentraciones de CO_2 y O_2 .

3.3.1 Determinación de aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2)

La determinación de las aflatoxinas totales al final del estudio se realizó con la prueba Agra-Quant® Determinación de Aflatoxinas Totales 1/20 (Romer Labs), que es un ensayo ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) directamente competitivo. Con esta prueba se pueden determinar de forma cuantitativa los niveles de aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2) en distintos productos como maíz, almendras, cerveza, aceite de canola, chiles, cebada malteada y pistachos.

El procedimiento seguido se muestra en la Figura 4.4.

El kit venía provisto con los siguientes materiales:

- 96 pocillos recubiertos con anticuerpos en una placa o soporte para pocillos.
- 96 pocillos de dilución no recubiertos.
- 6 viales de 1,5 mL de cada patrón de aflatoxinas (0, 1,0, 2,0, 4,0, 10,0 y 20,0 ppb).
- 1 botella de 25 mL de conjugado de aflatoxinas.
- 1 botella de 15 mL de solución de sustrato.
- 1 botella de 15 mL de solución stop.

De cada repetición de cada uno de los tratamientos, se molieron 50 g del maíz utilizando un molino de granos (Perten Instruments) hasta que el 75% de la muestra pasase por un tamiz con malla número 20 (0,850 mm de luz). A continuación, el maíz molido se mezcló bien, y se pesaron 4 g en un vial de centrifuga de 50 mL. De cada repetición se prepararon 2 viales, a cada uno de los cuales se les añadieron 20 mL de solución metanol/agua destilada (70/30). Los viales se agitaron manualmente y se dejaron en reposo durante 15 min. Posteriormente, se colocaron en un agitador Vórtex (Vórtex-Genie 2. Scientific Industries, Inc.) durante 3 minu-

tos a 1500 rpm. Una vez finalizado este proceso se centrifugaron las muestras durante 5 min a 3500 rpm. A continuación se retiró el sobrenadante y se analizó el pH de cada muestra, el cual debía estar entre 6 y 8. Si la muestra no estaba dentro de este rango de pH, éste se ajustaba añadiendo NaOH o HCl.

A continuación y con pipeta multicanal, se procedió a rellenar los pocillos no recubiertos con 200 μ L de conjugado de aflatoxinas. Después, con una pipeta monocal, se añadían 100 μ L de los patrones y de las muestras a cada uno de los pocillos. Con la ayuda de la pipeta multicanal, se pipeteaba 3 veces 100 μ L del contenido de los pocillos y se introducían en los pocillos de la placa con anticuerpos. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se rellenaron con agua destilada estéril y, a continuación, se vaciaron a modo de lavado. Esta operación se realizó 5 veces seguidas. Después, y con la ayuda de la pipeta multicanal, se añadieron 100 μ L de solución de sustrato a cada uno de los pocillos y se dejaron 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 100 μ L de solución stop y seguidamente con un lector ELISA se leyó la absorbancia con filtro de absorbancia de 450 nm y un filtro de referencia de 630 nm. La concentración de micotoxinas se calculó a partir de la densidad óptica obtenida de las muestras. Esta densidad se interpoló con la recta patrón de los estándares.

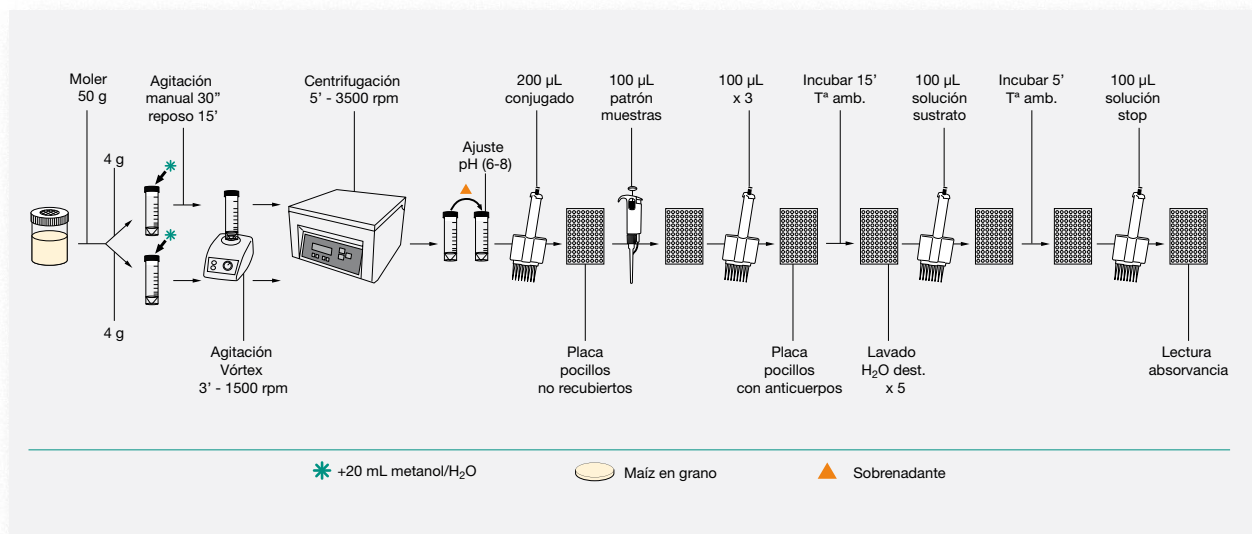


Figura 4.4: Procedimiento seguido para la determinación de de aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2) con la prueba AgraQuant® Determinación de Aflatoxinas Totales 1/20 (Romer Labs).

3.4. Efecto de las atmósferas modificadas sobre el control del gorgojo *Sitophilus zeamais* y de la producción de micotoxinas de *Aspergillus flavus* en maíz (ensayo 2).

Para la preparación de este ensayo se procedió de la misma manera que en el ensayo 1 (ver apartado 3.3), con la diferencia de que los tratamientos estudiados en este caso fueron los que se muestran a continuación:

- Maíz en grano con un ch del 16% (Maíz-16)
- Maíz en grano con un ch del 16% y *A. flavus* (Maíz-16-AF)
- Maíz en grano con un ch del 16% y *A. flavus* y *S. zeamais* (Maíz-16-AF-SZ)

- Maíz en grano con un ch del 16% y *A. flavus* y *S. zeamais* y un tratamiento con AMs (Maíz-16-AF-SZ-AM)
- Maíz troceado con un ch del 18% y *A. flavus* (MaízT-18-AF)

Se prepararon 5 repeticiones, en el mismo tipo de recipientes de cristal utilizados en el ensayo 1 (Figura 1.5 B, Capítulo 1), por cada tratamiento.

En este ensayo, la humedad ambiental del 80% se consiguió de forma distinta al procedimiento realizado en el ensayo 1. Se colocaron las repeticiones (150 g de maíz) de cada tratamiento en el mismo tipo de cajas de plástico utilizadas en el ensayo 1 (35 cm x 40 cm x 55 cm) (cada tratamiento en una caja), dentro de las cuales se introdujeron 2 L de agua. Los recipientes de cristal de los tratamientos se colocaron dentro de contenedores de plástico (sin tapa) de menor altura que los de cristal, para evitar que éstos se mojasen (Figura 4.5 A). Las cajas se abrieron parcialmente para evitar la acumulación de CO₂ que pudiera generarse (Figura 4.5 B). Semanalmente, en el interior de estas cajas se controló la humedad, con la sonda de humedad y temperatura TESTO Data logger 454, y la concentración de CO₂ y O₂ con el analizador de gases WITT OXYBABY 6.0. En el caso que la humedad no fuera la adecuada, se añadía o retiraba agua de la base de la caja.

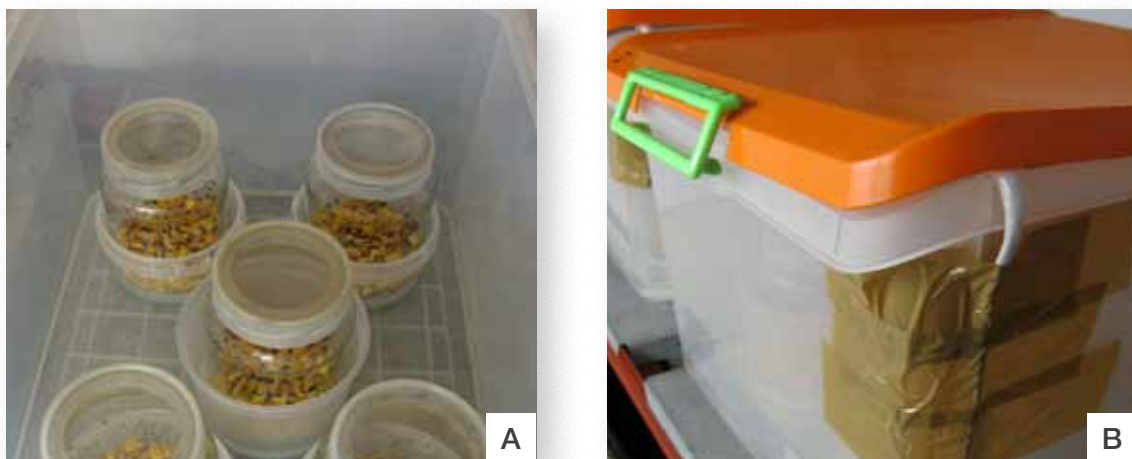


Figura 4.5: (A) Disposición de las repeticiones de cada tratamiento en el interior de las cajas a 25 ± 2 °C de temperatura y a $80 \pm 10\%$ de HR. (B) Detalle de la obertura de las cajas para evitar la acumulación de CO₂.

Después de 6 semanas desde el inicio del ensayo, se procedió a hacer el tratamiento con AMs con una alta concentración de CO₂ (Maíz-16-AF-SZ-AM). Para obtener la AM se utilizaron gases de calidad alimentaria (S.E. Carburos Metálicos, S. A.-Air Products Group) que se combinaron en el mezclador de gases WITT KM 100-3M/MEM. Las concentraciones iniciales de los gases de la mezcla fueron $90,15\% \pm 0,05$ CO₂ / $4,9\% \pm 0,1$ O₂ / $4,95\% \pm 0,05$ N₂. Para analizar la mezcla de gases, se utilizó el analizador de gases WITT OXYBABY 6.0.

Cada una de las repeticiones se colocó en bolsas impermeables a los gases, CRYOVAC BB4L de 300 x 210 mm y se envasaron con la mezcla de gases preparada previamente, utilizando la envasadora de campana de vacío compensado MULTIVAC A 300/16. Finalizado este proceso, las bolsas se volvieron a ubicar en la cámara climática.

Después de 9 semanas desde el inicio del ensayo, se analizó la mezcla de gases del interior de las bolsas del tratamiento con AMs, se abrieron los envases y su contenido se colocó en el mismo tipo de recipientes de cristal utilizados en los otros tratamientos. A continuación, estos recipientes se introdujeron en la cámara climática a 25 ± 2 °C y $80 \pm 10\%$ de HR.

Transcurridas 17 semanas desde el inicio del estudio, se procedió a hacer el recuento del número de adultos de *S. zeamais* vivos emergidos de los tratamientos que se habían infestado, el recuento de las unidades formadoras de colonias de hongos y levaduras por gramo de maíz (análisis realizado por el laboratorio Silliker Ibérica, S. A.) y, la determinación de la concentración de aflatoxinas (ppb) de todos los tratamientos con el kit Agraquant® (ver apartado 3.3.1).

3.5. Análisis de resultados

Los resultados obtenidos fueron tratados con el paquete estadístico JMP® 10.0.2 (SAS Institute, 2012).

En el tratamiento con AMs se calcularon las medias (\pm error estándar) de los análisis de CO₂ y O₂, al inicio y al final de cada uno de ellos. En cada ensayo se calcularon las medias y el error estándar de los resultados obtenidos. Mediante el test de Bartlett's se comprobó la homogeneidad de las varianzas. Los resultados que lo requerían se transformaban mediante el logaritmo (x+1).

Para comprobar si existían diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó un ANOVA de 1 vía. En caso afirmativo, se efectuó un test de Tukey Multiple Range para para comparar las medias.

4. Resultados

4.1. Efecto de la presencia del gorgojo *Sitophilus zeamais* sobre la producción de micotoxinas de *Aspergillus flavus* en maíz (ensayo 1)

En la Tabla 4.1 se muestran los resultados del número de *S. zeamais* emergidos, del número de colonias de hongos y levaduras, y del contenido de aflatoxinas de las muestras de todos los tratamientos del ensayo 1.

En el tratamiento con infestación de *S. zeamais* e inoculación de *A. flavus* se contabilizó un número de adultos del coleóptero superior a 960 de media, por repetición, al final del ensayo (Tabla 4.1).

Respecto al crecimiento del total de hongos, el tratamiento con presencia de insectos (Maíz-16-AF-SZ), fue en el que se detectó el número más elevado de colonias, concretamente de $1,6 \cdot 10^7$ ufc/g (7,2 (log(ufc/g))), seguido del tratamiento con maíz troceado con un 18% de ch y con

inoculación de *A. flavus* (MaízT-18-AF), en el que había 6,53 (log(ufc/g)) (Tabla 4.1). En las muestras formadas por maíz en grano y maíz en grano con inoculación de *A. flavus*, en las que el ch inicial del maíz fue del 16%, el recuento de hongos fue inferior a los tratamientos Maíz-16-AF-SZ y MaízT-18-AF, concretamente, los valores fueron de 4100 ufc/g (3,61 (log(ufc/g)) y 320 ufc/g (2,50 (log(ufc/g))), respectivamente (Tabla 4.1).

En todos los tratamientos el recuento de levaduras fue muy bajo e inferior a 1 (log (ufc/g)).

En cuanto al contenido en micotoxinas, los resultados mostraron un incremento significativo en las muestras con presencia de insectos, respecto a los demás tratamientos ($F= 4.01$; g. l.= 3, 37; $P<0.05$) (Tabla 4.1). Es importante resaltar que la concentración de micotoxinas en el tratamiento Maíz-16-AF-SZ fue significativamente más elevada que en las muestras procedentes del tratamiento MaízT-18-AF (Tabla 4.1). Este hecho se podría atribuir al distinto tipo de daño entre, el causado por el insecto (durante su alimentación) y el debido a la molturación manual. Por otro lado, cabe destacar que la presencia únicamente de *A. flavus* (Maíz-16-AF), no favoreció la producción de micotoxinas por encima de 10 ppb.

Tabla 4.1: Número de adultos de *S. zeamais*, logaritmo de unidades formadoras de colonias (ufc/g) de hongos y levaduras y, concentración de micotoxinas (ppb) (B1, B2, G1 y G2) al final del ensayo, en 150 g de maíz en grano inoculado con *A. flavus* (10 000 esporas/mL, 0,75 mL/repetición) (excepto en el tratamiento Maíz-16) y 225 adultos de *S. zeamais* por repetición en el tratamiento Maíz-16-AF-SZ. El contenido de humedad del maíz fue del 16% excepto en el tratamiento MaízT-18-AF que fue del 18%. En el tratamiento MaízT-18-AF, el maíz fue molturado mecánicamente. Las condiciones de almacenamiento fueron 25 ± 2 °C y $80 \pm 10\%$ HR. Se muestran las medias \pm error estándar.

Tratamiento	Nº adultos <i>S. zeamais</i>	Hongos (log (ufc/g))	Levaduras (log (ufc/g))	Micotoxinas (ppb)
Maíz-16	-	3,61 \pm 0,22	<1	1,10 \pm 0,37 b
Maíz-16-AF	-	2,50 \pm 0,23	<1	1,30 \pm 0,23 b
Maíz-16-AF-SZ	962,49 \pm 180,53	7,20 \pm 0,21	<1	19,61 \pm 13,03 a
MaízT-18-AF	-	6,53 \pm 0,23	<1	2,29 \pm 0,31 b

Las medias de cada columna seguidas de la misma letra, no son significativamente diferentes entre ellas ($P>0,05$, test Tukey, $n= 5$).

4.2. Efecto de las atmósferas modificadas sobre el control del gorgojo *Sitophilus zeamais* y la producción de micotoxinas de *Aspergillus flavus* en maíz (ensayo 2).

4.2.1. Evolución de la concentración de oxígeno y dióxido de carbono en el interior de las bolsas

En la Tabla 4.2 se muestran las medias de las concentraciones de CO₂ y O₂ en el interior de las bolsas, al inicio y al final de los tratamientos del ensayo Maíz-16-AF-SZ-AM.

No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de CO₂ al inicio y al final de los tratamientos ($F= 0,75$; g. l.= 1, 6; $P= 0,42$). La concentración de O₂ disminuyó significativamente de un valor de 4,9% al inicio del ensayo a un valor final de 1,96% ($F= 10,80$; g. l.= 1, 6; $P<0,05$) (Tabla 4.2).

Tabla 4.2: Concentraciones de CO₂ (%) y O₂ (%) (media ± error estándar) del interior de las bolsas que contenían las muestras de maíz envasadas en AMs, del tratamiento Maíz-16-AF-SZ-AM (maíz con un ch del 16%, adultos de *S. zeamais* y *A. flavus*).

Día	[CO ₂] (%)	[O ₂] (%)
0	90,15 ± 0,05	4,90 ± 0,10 a
21	88,18 ± 1,35	1,96 ± 0,50 b

Las medias de cada columna seguidas de la misma letra o sin letra, no son significativamente diferentes entre ellas ($P > 0,05$, test Tukey, $n = 5$).

4.2.2. Evolución de las poblaciones de insectos y micotoxinas

En la Tabla 4.3 se muestran los resultados del número de adultos de *S. zeamais* emergidos al final del ensayo, y del contenido de aflatoxinas de las muestras de todos los tratamientos.

Las muestras tratadas con AMs presentaron, al final del ensayo, una disminución estadísticamente significativa (87%) del número de adultos de *S. zeamais* respecto al tratamiento sin AMs Maíz-16-AF-SZ ($F = 1559,46$; g.l. = 1, 9; $P < 0,001$) (Tabla 4.3).

La presencia de insectos hizo que el recuento de hongos fuera mayor en el tratamiento con *A. flavus* y *S. zeamais* respecto a los otros tratamientos. Se observó que el tratamiento con AMs del maíz con hongo e insectos, hizo también disminuir la población de hongos, con respecto al tratamiento con *A. flavus* y *S. zeamais*, hasta un número de unidades formadoras de colonias, prácticamente igual que el de los tratamientos sin insectos (Tabla 4.3).

Respecto a las levaduras, se observó el mismo comportamiento que en los hongos, a diferencia de que en el tratamiento Maíz troceado (18% ch) no se detectaron colonias de estos microorganismos (Tabla 4.3).

Tabla 4.3: Número de adultos de *S. zeamais*, logaritmo de unidades formadoras de colonias (ufc/g) de hongos y levaduras y concentración de micotoxinas (ppb) (B1, B2, G1 y G2), al final del ensayo, en 150 g de maíz inoculado con *A. flavus* (10 000 esporas/mL, 0,75mL/repetición) (excepto en el tratamiento Maíz-16) y 225 adultos de *S. zeamais* por repetición (Maíz-16-AF-SZ; Maíz-16-AF-SZ-AM). El contenido de humedad del maíz fue del 16% excepto en el tratamiento MaízT-18-AF, que fue del 18%. En el tratamiento MaízT-18-AF, el maíz fue molturado mecánicamente. Las condiciones de almacenamiento fueron 25 ± 2 °C y 80 ± 10% HR. Se muestran las medias ± error estándar.

Tratamiento	Nº adultos <i>S. zeamais</i>	Hongos (log (ufc/g))	Levaduras (log (ufc/g))	Micotoxinas (ppb)
Maíz-16	-	5,70 ± 0,70	5,46 ± 0,37	0,57 ± 0,12 b
Maíz-16-AF	-	5,77 ± 0,69	5,59 ± 0,36	0,79 ± 0,04 b
Maíz-16-AF-SZ	960,60 ± 5,44 a	7,17 ± 0,67	7,17 ± 0,38	21,21 ± 6,49 a
Maíz-16-AF-SZ-AM	129,25 ± 20,34 b	5,23 ± 0,68	5,54 ± 0,36	0,94 ± 0,14 b
MaízT-18-AF	-	5,76 ± 0,68	<1	1,14 ± 0,09 b

Las medias de cada columna seguidas de la misma letra, no son significativamente diferentes entre ellas ($P > 0,05$, test Tukey, $n = 5$).

Las muestras con infestación de *S. zeamais* y sin AMs (Maíz-16-AF-SZ) presentaron una concentración de micotoxinas estadísticamente superior al resto de tratamientos ($F= 9,52$; g.l.= 4; 48; $P<0,001$) (Tabla 4.3). Si se compara este tratamiento (Maíz-16-AF-SZ) con su homólogo con AMs (Maíz-16-AF-SZ-AM), se observa que el contenido de micotoxinas disminuye significativamente (95,5%) por efecto de la AM aplicada. Cabe destacar que la concentración de aflatoxinas en las muestras tratadas con AMs, fue inferior a 1 ppb, siendo este valor significativamente igual al de los tratamientos sin *S. zeamais*. De igual forma que en el ensayo 1, ni la presencia del hongo por él mismo, ni el incremento del contenido de humedad en maíz dañado artificialmente favoreció la producción de micotoxinas.

5. Discusión

Las concentraciones más elevadas de micotoxinas se detectaron cuando el maíz estaba infestado con el insecto y tenía inóculo de *A. flavus* (Tablas 4.1 y 4.3). De hecho, la concentración de micotoxinas en estos tratamientos fue, aproximadamente, el doble del contenido permitido en maíz (10 ppb) (DOUE, 2010). Así pues, los resultados obtenidos confirman que la presencia de una alta población de *S. zeamais* puede favorecer las condiciones ambientales para el buen desarrollo de los hongos (Dowd, 1991). Mills (1983) comprobó que la presencia de insectos en granos de cereales almacenados, provoca un incremento de la temperatura y del contenido de humedad del grano, debido a la actividad metabólica de los insectos, condiciones que favorecerían el desarrollo de hongos. Sinha y Sinha (1991), también observaron un significativo aumento del contenido de humedad del grano de cereal, de la infección de *A. flavus* y de la producción de micotoxinas, en muestras de trigo (*Triticum vulgare* L.) infestado con *S. oryzae* e infectado con *A. flavus*. En su ensayo, la concentración final de micotoxinas detectadas fue de 850 ppb, valor muy elevado en comparación con el presente estudio (20 ppb, Tablas 4.1 y 4.3). Esto es así porque en el estudio de Sinha y Sinha (1991), la suspensión inicial de *A. flavus* utilizada fue del 3% mientras que en el presente estudio fue de sólo el 0,6%.

Otro factor a tener en cuenta en la concentración final de micotoxinas producidas es el sustrato alimentario utilizado, que en el caso de Sinha y Sinha (1991) fue trigo, que tiene más hendiduras que el de maíz y por lo tanto, podría haber favorecido en mayor medida el desarrollo del hongo. Además de estos condicionantes, y como ya se ha mencionado, la presencia de insectos pueden ayudar a diseminar las esporas del hongo, transportándolas en distintas partes de su cuerpo. Sinha y Sinha (1990), demostraron que adultos de *S. oryzae*, encontrados en muestras de trigo dañado, habían transportado esporas del hongo *A. flavus*, ya que aislaron el hongo de distintas zonas del insecto tales como patas, antenas, articulaciones y superficie del cuerpo. En un estudio anterior, Ragunathan *et al.* (1974) también habían aislado *A. flavus* de las larvas, las pupas y los adultos de *S. oryzae*. Aparte de transportar el hongo en su exterior, el insecto también puede transportarlo en su interior (Griffiths, 1959; Mc Millian, 1983; Beti *et al.*, 1995). De esta forma, el insecto contaminará el maíz defecando las esporas

del hongo en el grano (Beti *et al.*, 1995, Mc Millian, 1983). Las hembras de *S. zeamais* después de depositar el huevo en el interior del grano de maíz, cubren el orificio con una sustancia fecal la cual puede contener las esporas viables del hongo (Arbogast, 1991).

En los tratamientos (tanto en el ensayo 1 como en el ensayo 2), en los que se inoculó el hongo *A. flavus* pero en los que no había presencia de insectos, la concentración de micotoxinas detectada fue estadísticamente igual en todos ellos (Tablas 4.1 y 4.3) y por debajo del contenido máximo permitido (DOUE, 2010), aunque la HR fuera favorable para el desarrollo del hongo. Probablemente, si el contenido de humedad del grano hubiera sido superior al 16%, el nivel de aflatoxinas detectado hubiera sido más elevado, ya que los requerimientos mínimos de a_w , para que los hongos toxigénicos sinteticen micotoxinas, generalmente son más altos que las necesidades hídricas para su crecimiento (Sanchís *et al.*, 2004). Para *A. flavus*, la a_w óptima para su crecimiento es 0,80 (16% de ch, aproximadamente) a 25 °C, mientras que para que este hongo produzca aflatoxinas, la a_w óptima mínima debe ser 0,82 (>16% de ch) y 0,99 para una producción máxima (a 25 °C) (ICMSF, 1996).

En el tratamiento con maíz troceado con alto contenido de humedad (18%) e inóculo de *A. flavus*, se desarrolló un número elevado de hongos en los dos ensayos (Tablas 4.1 y 4.3). Sin embargo, éstos produjeron una concentración baja de micotoxinas debido, probablemente, a que a lo largo de las 17 semanas que duraron los ensayos, el contenido de humedad del grano de maíz se fue equilibrando con la HR del ambiente, haciendo que la a_w del maíz estuviera por debajo de la óptima para la producción de micotoxinas (<0.82). Al comparar este tratamiento con el tratamiento con *A. flavus* y *S. zeamais*, se observa que la concentración de micotoxinas fue más baja en el tratamiento de maíz troceado con alto contenido de humedad. Este hecho podría ser debido a que las larvas del insecto, durante su alimentación, hacen túneles en el interior del grano aumentando la superficie en la que el hongo puede desarrollarse y producir más micotoxinas. Además, el metabolismo del insecto provoca un incremento de la temperatura y del ch del sustrato (Mills, 1983; Sinha y Sinha, 1991), favoreciendo el desarrollo del hongo y la producción de micotoxinas.

En el segundo ensayo, en el tratamiento en el que se aplicó una mezcla de gases con elevada concentración de CO₂ (90,15 ± 0,05%) y baja concentración de O₂ (4,9 ± 0,1%) durante 3 semanas, se observó que la concentración de CO₂ en el interior de las bolsas que contenían las muestras, se mantuvo a lo largo de los 21 días del periodo de exposición a la AM, lo cual indica una buena estanqueidad de las bolsas utilizadas en el ensayo (CRYOVAC BB4L) (Tabla 4.2). La disminución de la concentración de O₂ al final del tratamiento fue debida, probablemente, al consumo de este gas por parte del hongo y los insectos presentes en las muestras (Tabla 4.2).

En este tratamiento, se observó una disminución estadísticamente significativa (87%) del número de insectos, en comparación con el mismo tratamiento pero sin la aplicación de las AMs (Tabla 4.3). Además, el número de colonias de hongos también disminuyó en el tratamiento con AMs, en comparación con el tratamiento que no había sido tratado con AMs, pero que contenía el hongo y los insectos. Riudavets *et al.* (2009) observaron que al aplicar AMs

con un 90% de CO₂ durante 12 días, se conseguían controlar todos los estadios de desarrollo del coleóptero *S. oryzae* en arroz. En el presente trabajo, después de 3 semanas de tratamiento con AMs con un 90% de CO₂, aproximadamente, se observó supervivencia de *S. zeamais*. Esta diferencia con respecto al estudio de Riudavets *et al.* (2009), podría ser explicada porque la HR en el presente estudio fue del 80 ± 10%, mientras que en el estudio de Riudavets *et al.* (2009) era del 70 ± 10%. Al aplicar un tratamiento en AMs con alta concentración de CO₂, uno de los principales efectos que produce este gas sobre los insectos, es la apertura de sus espiráculos, los cuales regulan la respiración y, a través de los cuales el insecto pierde agua (Nicollas y Sillans, 1989). Así, en el estudio de Riudavets *et al.*, (2009), al haber una HR más baja que en nuestro estudio, los insectos, probablemente, se desecaron y, por lo tanto, murieron antes. Sin embargo, aunque hubo presencia de insectos en este tratamiento, la concentración de micotoxinas fue muy baja (< 1 ppb) (Tabla 4.3). Esto podría haber sido debido a la significativa disminución del número de insectos observada en el tratamiento con AMs. Entonces, al haber menos insectos, hubo menos actividad metabólica y, consecuentemente, menos humedad en el grano. Esto hizo que el ch del grano no aumentara lo suficiente como para llegar al óptimo de producción de micotoxinas por parte de *A. flavus*. Por otro lado, la baja concentración de O₂ y la elevada concentración de CO₂ de las AMs aplicadas, también pudieron influir en la producción de micotoxinas. Giorni *et al.* (2009) demostraron que, aplicando AMs con un 25% de CO₂ se disminuía el desarrollo de *A. flavus*, mientras que al aumentar la concentración de CO₂ hasta, al menos, un 50% se reducía la producción de micotoxinas. Ellis *et al.* (1994) observaron que al aplicar AMs con un 65% de CO₂ y un 35% de N₂ a cacahuètes con *A. flavus*, conservados a 25°C, la concentración de micotoxinas se veía reducida en un 94.5%, con respecto a cacahuètes envasados en aire y conservados a la misma temperatura.

6. Conclusiones

1. La infestación de maíz en grano con *S. zeamais* y presencia del hongo *A. flavus* favorece las condiciones ambientales para el desarrollo del hongo.
2. La infestación del maíz con el coleóptero *S. zeamais* cuando el hongo *A. flavus* está presente, favorece la producción de micotoxinas por parte del hongo.
3. En el maíz troceado mecánicamente y con alto contenido de humedad inicial (18%), el hongo *A. flavus* inoculado, prácticamente no produce micotoxinas.
4. El tratamiento de maíz con atmósferas modificadas con alto contenido de CO₂ reduce la población del coleóptero *S. zeamais* y la producción de micotoxinas por parte del hongo *A. flavus*.

CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones generales

1. La aplicación del control biológico permite reducir las poblaciones de los insectos plaga *Sitophilus oryzae*, *Ephestia kuehniella* y *Plodia interpunctella*, durante el almacenamiento del sustrato alimentario. La posterior utilización de la tecnología de las atmósferas modificadas descarta la presencia de cualquier insecto vivo, tanto de los enemigos naturales, como de los insectos plaga que hayan podido quedar al final de los tratamientos.

2. La adición de SO_2 a atmósferas modificadas a presión atmosférica, con alta concentración de CO_2 aumenta la eficacia de éstas en el control de *S. oryzae* y *Tribolium confusum*.

3. El aumento de la eficacia de la combinación de atmósferas modificadas a presión atmosférica, con alta concentración de CO_2 y SO_2 varía según el estadio del desarrollo de las plagas y del sustrato alimentario presente durante el tratamiento.

4. La combinación de los bioactivos volátiles S-(+)-carvona, linalol o ácido propiónico con una atmósfera modificada, a presión atmosférica, con un 50% CO_2 , incrementa el control de los adultos de *S. oryzae* en comparación con la aplicación de los tratamientos por separado.

5. La infestación de grano de maíz con el coleóptero *S. zeamais* favorece la producción de micotoxinas por parte del hongo *Aspergillus flavus*.

6. El tratamiento del grano infestado con *S. zeamais* y el hongo *A. flavus*, con atmósferas modificadas, a presión atmosférica, con una alta concentración de CO_2 , reduce la población de la plaga y la producción de micotoxinas, respecto al tratamiento sin atmósferas modificadas.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Adam, B.D., Phillips, T.W. y Flinn, P., 2006.** The economics of IPM in stored grain: Why don't more grain handlers use IPM?. En: Lorini, I., Bacaltchuk, B., Beckel, H., Deckers, D., Sundfeld, E., dos Santos, J. P., Biagi, J. D., Celaro, J. C., Faroni, L. R. D'A., Bortolini, L. de O. F., Sartori, M. R., Elias, M. C., Guedes, R.N.C., da Fonseca, R.G., Scussel, V.M. (eds.). Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection. ABRAPOS, Campinas, Sao Paulo, Brazil.
- Adarkwah, C., Obeng-Ofori, D., Büttner, C., Reichmuth, C. y Schöller, M., 2012.** Potential of *Lariophagus distinguendus* (Förster) (Hymenoptera: Pteromalidae) to suppress the maize weevil *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) in bagged and bulk stored maize. *Biological Control*. 60(2), 175-181.
- Adler, C., Corinth, H.G. y Reichmuth, C., 2000.** Modified Atmospheres. En: Subramayan, Bh., Hangstrum, D. W. (eds.). Alternatives to Pesticides in Stored-Product IPM. Kluwer Academic Publishers, MA, USA. pp. 105-146.
- Alavanja, M.C., Rush, G. A., Steward, P. y Blair, A., 1987.** Propionate mortality study of workers in the grain industry. *J. Natl. Cancer Inst.* 78, 247-252.
- Ali-Niaze, M.T., 1971.** Effect of carbon dioxide gas on respiration of the confused flour beetle. *J. Econ. Entomol.* 64, 1304-1305.
- Annis, P.C. y Morton, R., 1997.** The acute mortality effects of carbon dioxide on various life stages of *Sitophilus oryzae*. *Journal of Stored Products Research*. 33(2), 115-124.
- Arbogast, R.T., 1991.** Beetles: Coleoptera. En: Gorham, J. R. (ed.). Ecology and management of food industry pests. FDA Tech. Bull. 4, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA. pp. 131-176.
- Arbogast, R.T., Kendra, P. E., Mankin, R. W. y Mc Govern, J. E., 2000.** Monitoring insect pests in retail stores by trapping and spatial analysis. *J. of Econ. Entomol.* 93(5), 1531-1542.
- Arbogast, R. T., LeCato, G. L. y Byrd, R. D., 1980.** External morphology of the eggs of the moth, *Pyralis farinalis* (L.), and the murky meal moth, *Anglossa caprealis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 1, 419-423.
- Attia, R., 1948.** Typical methods of handling and storing grain in Egypt. En: Int. Meet. On Infestations of Foodstuffs. S. S. Easter, Ed. Agric. Stud. 2. 105 pp.

-
- Bailey, S. W., 1955.** Air-tight storage of grain: its effect on insect pests. I. *Calandra granaria* L. (Coleoptera: Curculionidae). Aust. J. Agric. Res. 6, 33-51.
- Banks, H. J. y Annis, P. C., 1990.** Comparative advantages of high CO₂ and low O₂ types of controlled atmospheres for grain storage. En: Calderon, M., Barkai-Golan, R. (Eds.). Food preservation by modified atmospheres. CRC Press, Inc., Boca Raton. Florida, USA. pp: 93-122.
- Beckett, S. J., Longstaff, B. C. y Evans, D. E., 1994.** A comparison of the demography of four major stored grain coleopteran pest species and its implications for pest management. Highley, E., Wright, E. J., Banks, H. J. y Champ, B.R. (eds.). Proceedings 6th International Workshop and Conference on Stored-Product Protection. CAB, Wallingford, UK. pp.491-497.
- Bell, C. H., 1984.** Effects of oxygen on the toxicity of carbon dioxide to storage insects. En: Ripp, B.E. (ed.), Controlled Atmosphere and Fumigation of Grain Storages. Elsevier, Amsterdam. pp. 67-74.
- Bellows, T. S., 1985.** Effects of host age and host availability on developmental period, adult size, sex ratio, longevity and fecundity in *Lariophagus distinguendus* Förster (Hymenoptera: Pteromalidae). Researches on Population Ecolog. 27 (1), 55-64.
- Beti, J. A., Phillips, T. W. y Smalley, E. B., 1995.** Effects of maize weevils (Coleoptera: Curculionidae) on production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus* in stored corn. J. of Econ. Entomol. 88(6), 1776-1182.
- Boczeck, J., 1991.** Mite Pests in Stored Food. En: Gorham, J. R. (ed.). Ecology and Management of Food-Industry Pests, FDA Technical bulletin, 4. Association of Official Analytical Chemist. Virginia. pp. 57-79.
- Bond, E. J. y Buckland, C. T., 1978.** Control of insects with fumigants at low temperatures: Toxicity of fumigants in Atmospheres of Carbon dioxide. J. Econ. Entomol. 71; 307-309.
- Brieger, W., 1918.** Gasbäder mit Schwefeldioxyd [Gas baths with SO₂]. Naturwissenschaften. 50, 739.
- Brower, J. H., 1988.** Population suppression of the almond moth and the Indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae) by release of *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) into simulated peanut storages. J. Econ. Entomol. 81, 944-948.
- Burges, H. D. y Haskins, K. P. F., 1964.** Life-cycle of the tropical warehouse moth, *Cadra cautella* (Wlk.), at controlled temperatures and humidities. Bull. Entomol. Res. 55, 775-789.

-
- Carvalho, M. O., Pires, I., Barbosa, A., Barros, G., Riudavets, J., Garcia, A., Brites, C. y Navarro, S., 2012.** The use of modified atmospheres to control *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus oryzae* on stored rice in Portugal. *J. of Stored Prod. Res.* 50, 49-56.
- Chant, D. A., 1963.** The subfamily Blattisocinae garman (=Aceosejinae Evans) (Acarina: Blattisocidae Garman) (=Aceosejinae Baker and Wharton) in north America, with descriptions of new species. *Canadian J. of Zool.* 41 (2), 243-305.
- Conyers, S. T. y Bell, C. H., 2007.** A novel use of modified atmospheres: Storage insect population control. *J. of Stored Prod. Res.* 43(4), 367-374.
- Darst, P. H. y King, E. W., 1969.** Biology of *Melichares tarsalis* in association with *Plodia interpunctella*. *Annals of the Entomol. Soc. of America.* 62(4), 747-749.
- Daumal, J., 1987.** Contribution à L' Étude de La Biologie D' *Ephestia Kuehniella* Zeller (Lep. Pyralidae-Phycitinae). Application Aux Élevages Intensifs". Thèse Doctoral. INRA. Station de Zoologie et de Lutte Biologique. Antibes.
- Daumal, J., Voegele, J. y Brun, P., 1975.** Trichogramma. II. - A unit for the mass production on a daily basis of a substitute host *Ephestia kuehniella* Zell. (Lepidoptera, Pyralidae). *Annales de Zoologie, Ecologie Animale.* 7(1), 45-59.
- Davidson, P. M. y Juneja, V. K., 1990.** Antimicrobial agents. En: Branen, A. L., Davidson, P. M., Salminen, S. (eds.), *Food Additives.* Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 83-137.
- Don-Pedro, K. N., 1996.** Investigation of single and joint fumigant insecticidal action of citrus-peel oil components. *Pesticide Science.* 46(1), 79-84.
- Don-pedro, K. N., 1996.** Fumigant toxicity of citruspeel oils against adult and immature stages of storage insect Pests. *Pestic. Sci.* 47, 213-223.
- Doud, C. W. y Phillips, T. W., 2000.** Activity of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in and Around Flour Mills. *J. of Econ. Entomol.* 93(6), 1842-1847.
- DOUE, 2006.** Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (CE) no 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006. pp. 5-24.
- Dowd, P. F., 1991.** Nitidulids as vectors of mycotoxin-producing fungi. En: Shotwell, O. L. y Hurburgh, C. R. (eds.). *Aflatoxin in corn. New perspectives.* North Central Regional Research Publication 329. Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station, A. pp. 335-342.

-
- Dowd, P.F., 1998.** Involvement of arthropods in the establishment of mycotoxigenic fungi under field conditions. En: Shinha, K. K. Bhatnagar, D. (ed.), *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Marcel Dekker, New York. pp. 307-350.
- Van Driesche, R. G. y Bellows, T. S., 1996.** *Biological Control*. Chapman & Hall. New York. 539 pp.
- Ebeling, W., 1996.** *Pests of Stored Food Products*. Urban entomology. UC Riverside Entomology. Disponible en: <http://www.entomology.ucr.edu/ebeling/ebeling7.html>. (Consultado en Enero de 2014).
- Edwards, L. J. y Batten II, R., 1973.** Oxygen consumption in carbon dioxide anesthetized house flies, *Musca domestica* Linn. (Diptera: Muscidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 44A, 1163-1167.
- Ellis, W. O., Smith, J. P., Simpson, B. K., Ramaswamy, H. y Doyon, G., 1994.** Growth of and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts stored under modified atmosphere packaging (MAP) conditions. *Int. J. of Food Microbiol.* 22(2-3), 173-187.
- Emekci, M., 2010.** Quo Vadis the fumigants? *J. Kühn Arch.* 425, 303-313.
- FAO, 2012.** Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo. Alcance, causas y prevención. Disponible en : <http://www.fao.org/docrep/016/i2697s/i2697s.pdf> (consultado en Enero de 2014).
- FAO, 2014.** Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en: <http://faostat.fao.org/> (Consultado en Enero de 2014).
- Fargo, W. S., Epperly, D., Cuperus, G. W., Clary, B. C. y Noyes, R., 1989.** Effect of temperature and duration of trapping on four stored grain insect species. *J. of Econ. Entomol.* 82, 970-973.
- FDA. Food additives. U. S. Food and Drug Administration., 2014.** Disponible en: <http://www.fda.gov/Food> (visitado en Enero de 2014).
- FiBL, 2011.** *African Organic Agriculture Training Manual*. Version 1.0, June 2011. Weidmann, G. y Kilcher, L. (eds.). Research Institute of Organic Agriculture FiBL, Frick. Switzerland.
- Fleurat-Lessard, F., 1990.** Effect of modified atmospheres on insects and mites infesting stored products. En: *Food Preservation by modified atmospheres*. Calderon, M. y Barkai-Golan, R. (eds.). CRC press, Inc., Boca Raton, Florida, USA. pp. 21-38.
- Flinn, P., Hagstrum, D., Reed, C. y Phillips, T., 2003.** United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service stored-grain areawide, Integrated Pest Management program. *Pest Management Science.* 59(6-7), 614-618.

-
- Fraenkel, G. y Blewett, M., 1946.** The dietetics of the caterpillars of three *Epehestia* species, *E. kuehniella*, *E. elutella*, and *E. cautella*, and of a closely related species, *Plodia interpunctella*. The J. of Experimental Biol. 22, 162-71.
- Frickhinger, H. W., 1934.** Gase in der Schädlingsbekämpfung: eine Zusammenfassung für Amtsärzte, Desinfektoren, Hygieniker, Kommunalverwaltungen usw [Fumigants for pest control: a summary for medical officers, disinfectors, hygienists, local governments, etc.]. Anz. Schäd. 10, 49.
- Gage, M. J. G., 1995.** Continuous Variation in Reproductive Strategy as an Adaptive Response to Population Density in the Moth *Plodia interpunctella*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 261(1360), 25-30.
- Garry, V., Griffith, J., Danzl, T., Nelson, R., Whorton, E., Krueger, L. y Cervenka, J., 1989.** Human genotoxicity: pesticide applicators and phosphine. Science. 246(4927), 251-255.
- Germinara, G., Conte, A., Lecce, L., Di Palma, A. y Del Nobile, M. A., 2010.** Propionic acid in bio-based packaging to prevent *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Dryophthoridae) infestation in cereal products. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 11(3), 498-502.
- Germinara, G. S., Rotundo, G. y De Cristofaro, A., 2007.** Repellence and fumigant toxicity of propionic acid against adults of *Sitophilus granarius* (L.) and *S. oryzae* (L.). J. of Stored Prod. Res., 43(3), 229-233.
- Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A. y Magan, N., 2008.** Effect of a_w and CO_2 level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. Int. J. of Food Microbiol. 122(1-2), 109-113.
- Girish, S.K., 1980.** Studies on the preservation of foodstuffs under natural airtight storage. En: Proc. Int. Symp. on Controlled Atmosphere Storage of Grains. J. Shejbal, Ed. Elsevier, Amsterdam. 15-24.
- Gorham, J.R., 1979.** The Significance for Human Health of Insects in Food. Annual Review Entomol. 24, 209-224.
- Gorham, J. R., 1991.** (Ed.). Ecology and Management of food-industry pests. FDA Technical Bulletin 4. Association of official analytical chemists. Arlington, Virginia, USA. 594 pp.
- Griffiths, D. A., Hodson, A. C. y Christensen, C. M., 1959.** Grain storage fungi associated with mites. J. Econ. Entomol. 52, 514-518.

-
- Haines, C. P., 1981.** Laboratory studies on the role of an egg predator *Blattisocius tarsalis* (Berlese) (Acari: Ascidae), in relation to the natural control of *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) in warehouses. Bull. Entomol. Res. 71, 555-574.
- Houghton, P. J., Ren, Y. y Howes, M. J., 2006.** Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. Natural product reports. 23(2), 181-99.
- Howe, R. W. y Hardy, C., 1965.** A summary of estimates of optimal and minimal conditions for population increase of some stored products insects. J. Stored Prod. Res.1, 177-184.
- Hyde, M. B., Baker, A. A., Ross, A. C. y Lopez, C. O., 1973.** Airtight grain storage. FAO Agric. Serv. Bull. 17. Food and Agric. Organization, Rome. 71 pp.
- Hyde, M. B. y Daubney, C. G., 1960.** A study of grain storage fossae in Malta. Trop. Sci. 2, 115-129.
- IARC, 2014.** Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. Disponible en: <http://www.iarc.fr/> (consultado en Enero de 2014).
- ICMSF, 1996.** International Comision of Microbiological specifications for Foods. Microorganisms in Foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. Blackie Academic & Professional, London.
- Isikber, A. A., 2010.** Fumigant toxicity of garlic essential oil in combination with carbon dioxide (CO₂) against stored-product insects. Julius-Kühn-Archiv. (425). 371-376.
- Janmaat, A. F., de Kogel, W. J. y Woltering, E. J., 2001.** Enhanced fumigant toxicity of p-cymene against *Frankliniella occidentalis* by simultaneous application of elevated levels of carbon dioxide. Pest Management Science. 58(2), 167-73.
- Johnson, J. A. y Wofford, P. L., 1992.** Effect of Diet and Temperature on Development Rates , Survival , and Reproduction of the Indianmeal Moth (Lepidoptera: Pyralidae). Vol: 10.
- Kamel, A. H., 1980.** Underground storage in some Arab countries. En: Shejbal, J. (ed.). Proc. Int. Symp. on Controlled Atmosphere Storage of Grains. Elsevier, Amsterdam. 25-38.
- Ketoh, G. K., Glitho, A. I. y Huignard, J., 2002.** Susceptibility of the bruchid *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) to three essential oils. 95(1), 174-182.
- Korunic, Z., Rozman, V. y Kalinovic, I., 2008.** The potential use of natural essential oils in the fumigation of stored agricultural products. En: Credland, P. F., Armitage, D. M., Bell, C. H., Cogan, P. M. y Highley, E. (eds.). Proceedings of the 8th International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products, 21-26 Septiembre de
-

2008. Chengdu, China. Sichuan Publishing House of Science and Technology, Chengdu, China. pp. 511-519.

Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N. y Shaaya, E., 2002a. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest management science*. 58(11), 1101-1106.

Kostyukovsky, M., Ravid, U. y Shaaya, E., 2002b. The potential use of plant volatiles for the control of stored product insects and quarantine pests in cut flowers. *Proc. Int. Conf. on MAP*. Bernáth, J., Zámboiné Németh, E., Craker, L. y Köck, O. (eds.). ISHS Acta Hort. 576 pp.

Lamboni, Y. y Hell, K., 2009. Propagation of mycotoxigenic fungi in maize stores by post-harvest insects. *Int. J. of Tropical Insect Sci.* 29(01), 31.

Lee, S., Peterson, C. J. y Coats, J. R., 2003. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *J. of Stored Prod. Res.* 39(1), 77-85.

Lee, S., Lee, B. H., Choi, W. S., Park, B. S., Kim, J. G. y Campbell, B. C., 2001. Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L). *Pest Management Sci.* 57(6), 548-53.

Locatelli, D. P., Suss, L. y Frati, M., 1999. The use of high pressure carbon dioxide (20 bar) to control some insects of foodstuff. En: Zuxun, J., Quan, L., Yongsheng, L., Xianchang. T. y Lianghua, I. G. (eds.). *Proc. 7th International Working Conference on Stored Product Protection*. Sichuan Publishing House of Science & Technology, Sichuan Province, China. pp. 671-675.

López, M. D. y Pascual-Villalobos, M. J., 2008. Insecticidal activity of volatile monoterpenoids to *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae), *Rhyzopertha dominica* Fabricius (Coleoptera: Bostrichidae) and *Cryptolestes pusillus* Schönherr (Coleoptera: Cucujidae). *IOBC wprs Bull.* 40, 211-219.

Lorenz, S., Schöller, M. y Reichmuth, C., 2010. Efficacy of propionic acid against the granary weevil *Sitophilus granarius* (L.). En: Carvalho, M.O., Fields, P. G., Adler, C. S., Arthur, F. H., Athanassiou, C. G., Campbell, J. F., Fleurat-Lessard, F., Flinn, P. W., Hodges, R. J., Isikber, A. A., Navarro, S., Noyes, R. T., Riudavets, J., Sinha, K. K., Thorpe, G. R., Timlick, B. H. y Trematerra, P. (eds.). *10th International Working Conference on Stored Product Protection, Julius-Kühn-Archiv.* 425, 906-909.

Lucas, É. y Riudavets, J., 2000. Lethal and sublethal effects of rice polishing process on *Sitophilus oryzae* (Coleoptera : Curculionidae). *J. of Econ. Entomol.* 93(6), 1837-1841.

-
- Lucas, É. y Riudavets, J., 2002.** Biological and mechanical control of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) in rice. *J. of Stored Prod. Res.* 38(3), 293-304.
- Madrid, F. J. y Sinha, R. N., 1982.** Feeding damage of three stored-product moths (Lepidoptera: Pyralidae) on wheat. *J. of Econ. Entomol.* 75(6), 1017-1020.
- Magan, N., Hope, R., Cairns, V. y Aldred, D., 2003.** Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European J. of Plant Pathol.* Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 109, 723-730.
- Mann, D. D., Jayas, D. S., White, N. D. G. y Muir, W. E., 1999.** Mortality of adult *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) exposed to changing CO₂ concentrations. *J. Stored Prod. Res.* 35, 385-395.
- Marco, V., Jacas, J., Budia, F. Adán, A., Del Estal, P. y Viñuela, E., 1993.** Manejo de *Ephestia kuehniella* Zell. (Lepidoptera: Pyralidae) para evaluar la toxicidad de plaguicidas en laboratorio. *Bol. San. Veg. Plagas.* 19 (4), 587-596.
- Mason, L. J., Strait, C. A., Woloshuk, C. P. y Maier, D. E., 1999.** Controlling stored grain insects with ozone fumigation. En: Jin, Z.; Liang, Q.; Liang, Y.; Tan, X.; Guan, L. (eds.). Proceedings of the 7th International Working Conference on Stored Product Protection, 14-19 Octubre, 1998, Beijing, China. Sichuan Publishing House of Science and Technology, Chengdu, China. 1, 536-547.
- Mathew, N. D., Schlipalius, D. I. y Ebert, P. R., 2011.** Sulfurous gases as biological messengers and toxins: comparative genetics of their metabolism in model organisms. *J. Toxicol.* Article ID 394970, doi:10.1155/2011/394970.
- Mc Millian, W. W., 1983.** Role of arthropods in field contamination. En: Diener, U. L., Asquith, R. L. y Dickens, J. W. (eds.). Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. Southern Cooperative Series Bulletin 279. Auburn University, Alabama. pp. 20-22.
- Mills, J. T., 1983.** Insect-fungus association influencing seed deterioration. *Phytopathology.* 73, 330-335.
- Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, 2014.** Disponible en: <http://www.magrama.gob.es/>.
- Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad., 2014.** Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/productos.do?tipo=biocidas>.
- Mitcham, E., Martin, T. y Zhou, S., 2006.** The mode of action of insecticidal controlled atmospheres. *Bull. Entomol. Res.* 96, 213-222.

-
- Mitcham, E. J., Zhou, S. y Bikoba, V., 1997.** Controlled atmosphere for quarantine control of three pests of table grape. *J. Econ. Entomol.* 90, 1360-1370.
- Nattudurai, G., Paulraj, M .G. y Ignacimuthu, S., 2012.** Fumigant toxicity of volatile synthetic compounds and natural oils against red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. of King Saud University-Science.* 24(2), 153-159.
- Navarro, S., 1978.** The effects of low oxygen tensions on three stored-product insect pests. *Phytoparasitica.* 6, 51-58.
- Navarro, S., 2004.** Potential biological control methods of pests of dried fruit, cocoa and spices. En: Stengard Hansen, L., Wakefield, M., Lukas, J. y Stejskal, V. (eds.) Proceedings, 4th meeting of COST Action 842 WG4: "Biocontrol of arthropd pests in stored products", Atenas, 24-25 Mayo. pp. 34-38.
- Navarro, S., 2006.** Modified atmospheres for the control of stored product insects and mites. En: Heaps J.W. (ed.). *Insect management for food storage and processing.* AACC International, St. Paul, Minnesota, USA. pp. 105-145.
- Navarro, 2012.** The use of modified and cotrolled atmospheres for the disinfestation of stored products. *J. Pest Sci.* 85, 301-322.
- Navarro, S., Donahaye, J. y Finkelman, S., 2008.** Restrictions to the use of fumigants and opportunities for substitution with botanicals and modified atmospheres. *IOBC/WPRS Bulletin.* Vol. 40, 9-22.
- Navarro, S. y Noyes, R., 2002.** The mechanics and physiscs of modern grain aeration management. CRC Press. Boca Raton, FL. 647 pp.
- Nicolas, G. y Sillans, D., 1989.** Immediate and Latent Effects of Carbon Dioxide on Insects. *Ann. Rev. of Entomol.* 34(1), 97-116.
- Nielsen, P.S., 1999.** The impact of temperature on activity and consumption rate of moth eggs by *Blattisocius tarsalis* (Acari : Ascidae). *Experimental & Applied Acarology.* 23, 149-157.
- Nielsen, P.S., 2003.** Predation by *Blattisocius tarsalis* (Berlese) (Acari: Ascidae) on eggs of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *J. of Stored Prod. Res.* 39(4), 395-400.
- Oxley, T.A., 1948.** The scientific principles of grain storage. The Northern Publishing Co. Ltd., Liverpool. 103 pp.

-
- Papachristos, D. P. y Stamopoulos, D. C., 2002.** Toxicity of vapours of three essential oils to the immature stages of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). J. of Stored Prod. Res. 38(4), 365-373.
- Pascual-Villalobos, M. J., 2003.** Occurrence of coleoptera and lepidoptera species in rice stores at Calasparra (Murcia , Spain). 9th International Working Conference on Stored Product Protection. pp. 387-391.
- Paster, N., 1990.** Modified atmospheres for preventing molds and mycotoxin production in stored grain. En: Calderon, M. y Barkai-Golan, R. (eds.). Food Preservation by Modified Atmospheres. CRC Inc., Boca Raton. Florida, USA. pp: 39-55.
- Pedersen, J.R., 1992.** Insects: identification, damage, and detection. En: Sauer, D. B. (ed.). Storage of cereal grains and their products. Fourth edition. American Association of Cereal Chemist, Inc. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 435-489.
- Peters, G., 1936.** Sammlung Chemischer und Chemisch-Technischer Vorträge, Neue Folge, Heft 31. Chemie und Toxikologie der Schädlingsbekämpfung [Chemistry and toxicology of pest control]. Verlag von Ferdinand Enke, Stuttgart, Germany.
- Phillips, T. W. y Throne, J. E., 2010.** Biorational Approaches to Managing Stored-Product Insects. An. Rev. of Entomol. 55, 375-397.
- Raeker, M. O., Bern, C. J., Johnson, L. A. y Glatz, B. A., 1992.** Preservation of high-moisture maize by various propionate treatments. Cereal Chemistry. 69, 66-69.
- Ragunathan, A. N., Srinath, D. y Majumdar, S. K., 1974.** Storage fungi associated with rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). J. Food Sci. Technol. 11, 19-22.
- Rajendran, S. y Sriranjini, V., 2008.** Plant products as fumigants for stored-product insect control. J. of Stored Prod. Res. 44(2), 126-135.
- Riudavets, J. Castañé, C., Alomar, O., Pons, M. J. y Gabarra, R., 2006.** Response of eleven stored product pest species to modified atmospheres with high carbon dioxide concentrations. En: Lorini, I., Bacaltchuck, B., Beckel, H., Deckers, D., Sundfeld, E., dos Santos, J. P., Biagi, J. D., Celaro, J. C., Faroni, L. R. D' A., Bortolini, L. de O. F. y Sartori, M. R. (eds.). Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product. pp. 578-585.
- Riudavets, J., Castañé, C., Alomar, O., Pons, M. J. y Gabarra, R., 2009.** Modified atmosphere packaging (MAP) as an alternative measure for controlling ten pests that attack processed food products. J. of Stored Prod. Res. 45(2), 91-96.

-
- Riudavets, J., Castañé, C., Alomar, O., Pons M. J. y Gabarra, R., 2010.** The use of carbon dioxide at high pressure to control nine stored-product pests. *J. of Stored Prod. Res.* 46: 228-233.
- Riudavets, J., Gabarra, R., Pons, M. J., Castañé, C., Alomar, O. y Guri, S., 2008.** Toxicity effects of high carbon dioxide modified atmospheres in combination with sulphur dioxide on the rice weevil *Sitophilus oryzae*. En: Daolin, G., Navarro, S., Jian, Y., Cheng, T., Zuxum, Yue, L., Yang, L., Haipeng, W. (eds.), *Proceedings of the 8th International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*. Chengdu, China, Sep. 21 - 26. Sichuan Publishing Group, China. pp. 21-26.
- Riudavets, J. y Lucas, E., 2000.** Biological control of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) in rice and combined effects with polishing process, *Integrated Protection of Stored Products*. IOBC Bulletin. 23 (10), 143-148.
- Riudavets, J., Lucas, E. y Pons, M. J., 2002a.** Insects and mites of stored products in the northeast of Spain. *IOBC/WPRS Bulletin*. 25 (3), 41-44.
- Riudavets, J., Maya, M. y Montserrat, M., 2002b.** Predation by *Blattisocius tarsalis* (Acari: Ascidae) on stored-product pests. *IOBC/wprs Bulletin*. 25 (3), 121-126.
- Riudavets, J. y Quero, R., 2003.** Prey preference of the predatory mite *Blattisocius tarsalis* (Acari: Ascidae). En: Credland, P. F., Armitage, D. M., Bell, C. H., Cogan, P. M. y Highley, E. (eds.). *Advances in Stored Product Protection. Proceedings of the 8th International Working Conference Advances on Stored Product Protection, 22-26 julio 2002, York, UK*. CAB International, Wallingford, United Kingdom. pp. 297-299.
- Riudavets, J., Sánchez Molino, F. J., Castañé, C. y Gabarra, R., 2004.** Procedimiento para el control de plagas en productos agroalimentarios mediante tratamiento con CO₂ a presión. España, Ponti Sales, Adelaida. ES 2 186 559 B1.
- Roesli, R. Subramanyam, B., Campbell, J. F. y Kemp, K., 2003.** Stored-Product Insects Associated with a Retail Pet Store Chain in Kansas. *J. of Econ. Entomol.* 96(6), 1958-1966.
- Ryoo, M. I., Hong, Y. S. y Yoo, C. K., 1991.** Relationship between temperature and development of *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae), an ectoparasitoid of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *J. of Econ. Entomol.* 84, 825-829.
- De Saint Georges-Grèdelet, D., 1984.** Effects of dietary lipids on the population growth of *Dermatophagoides pteronyssinus*. En: Griffiths, D. A., y Bowmann, C. E. (eds.). *Proceedings of 6th International Congress of Acarology, Chichester*. 1, 351-357.
- Sánchez, F. J., Alomar, O., Riudavets, J. y Gabarra, R., 2007.** Procedure for the treatment of packaged agricultural food products. Ponti Sales, Adelaida. EP 1 523 250 B1.
-

-
- Sanchis, V. y Magan, N., 2004.** Environmental profiles for growth and mycotoxin production. En: Magan, N. y Olsen, M. (eds.). *Mycotoxins in food: Detection and control*. Woodhead Publishing Ltd. 488 pp.
- SAS Institute, 2012.** JMP 10.0.2 statistical package. SAS Institute Inc, Cary, North Carolina, USA.
- Sauer, J. A. y Shelton, M. D., 2002.** High-temperature controlled atmosphere for postharvest control of Indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae) on preserved flowers. *J. Econ. Entomol.* 95, 1074-1078.
- Schöller, M. y Prozell, S., 2003.** Biological Control. En: Credland, P. F., Armitage, D. M., Bell, C. H., Cogan, P. M. y Highley, E. (eds.). *Advances in Stored Products Protection. Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored Product Protection*. CABI Publishing. pp: 1057-1058.
- Sétamou, M., Cardwell, K. F., Schulthess, F. y Hell, K., 1998.** Effect of insect damage to maize ears, with special reference to *Mussidia nigrivenella* (Lepidoptera : Pyralidae), on *Aspergillus flavus* (Deuteromycetes : Monoliales) infection and Aflatoxin Production in Maize Before Harvest in the Republic of Benin. pp. 0-5.
- Shaaya, E., Kostjukovsky, M., Atsmr, S. y Chen, B. 1999.** Alternatives to methyl bromide for the control of insects attacking stored products and cut flowers. En: Zuxun, J., Quan, L., Yongsheng, L., Xianchang. T. y Lianghua, I. G. (eds.). *Proc. 7th International Working Conference on Stored Product Protection*. Sichuan Publishing House of Science & Technology, Sichuan Province, China. 1, 526-530.
- Shaaya, E., Ravid, U., Paster, N., Juven, B., Zisman, U. y Pissarev, V., 1991.** Fumigant toxicity of essential oils against four major stored-product insects. *J. of Chem. Ecol.* 17(3), 499-504.
- Sigaut, F., 1980.** Significance of underground storage in traditional systems of grain production. En: Shejbal, J. (ed.). *Proceedings of International Symposium on Controlled Atmosphere Storage of Grains*. Elsevier, Amsterdam. pp. 3-13.
- Simpson, T., Bikoba, V. y Mitcham, E., 2004.** Effects of ethyl formate on fruit quality and target pests mortality for harvested strawberries. *Postharvest Biol. Technol.* 34, 313-319.
- Sinha, A. K. y Sinha, K. K., 1990.** Insect pests, *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination in stored wheat: a survey at North Bihar (India). *J. Stored Prod. Res.* 26, 223-226.

-
- Sinha, K. K. y Sinha, A. K., 1992.** Impact of stored grain pests on seed deterioration and aflatoxin contamination in maize. *J. Stored Prod. Res.* 28(3), pp. 211-219.
- Sittisuang, P. y Imura, O., 1987.** Damage of rough and brown rice by four stored-product insect species. *Appl. Ent. Zool.* 22 (4), 585-593.
- Steffan, J. R., 1963.** Les calandres des grains (*Sitophilus*). En: Balachowsky, A. S. (ed.), *Entomologie appliquée à l'agriculture*. Masson et Comp, Paris. 1 (2). pp. 1070-1099.
- Stratford, M. y Rose, A. H., 1986.** Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 132, 1-6.
- Taniwaki, M. H., Hocking, A. D., Pitt, J. I. y Fleet, G. H., 2009.** Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *Int. J. of Food Microbiol.* 132(2-3), pp.100-108.
- Taniwaki, M. H., Hocking, A. D., Pitt, J. I. y Fleet, G. H., 2010.** Growth and mycotoxin production by fungi in atmospheres containing 80% carbon dioxide and 20% oxygen. *Int. J. of Food Microbiol.* 143(3), pp.218-25.
- The European Commission. Health and Consumers. Food, 2014.** Disponible en: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/additives/index_en.htm (visitado en Enero de 2014).
- The European Parliament and the Council of the European Union, 2008.** Regulation (EC) no. 1333/2008 of the European Parliament and of the council of 16 December 2008 on food additives. *Off. J. Eur. Un. L* 354, 16-33.
- Tripathi, A. K., Prajapati, V., Gupta, R. y Kumar, S., 1999.** Herbal material for the insect pest management in stored grains under tropical conditions. *J. of Medicinal and Aromatic Plant Sciences.* 21(2), 408-430.
- Tzanakakis, M. E., 1959.** An ecological study of the Indian-meal moth *Plodia interpunctella* (Hübner) with emphasis on diapause. *Hilgardia.* 29 (5), 205-246.
- UNEP (United Nations Environment Programme), 2006.** Report of the Technology and economic assessment panel. August, 2007. Evaluation of 2007 critical use nominations for Methyl Bromide and related matters. Disponible en: <http://www.unep.org/> (visitado en Enero de 2014).
- Vail, P. V., Tebbets, J. S. y Smilanick, J., 1992.** Sulfur dioxide control of omnivorous leafroller in the laboratory. En: Burditt Jr., A. K. (ed.), *Insecticide & Acaricide Tests: 1992*. Entomological Society of America, Lanham, MD. pp. 371-372.

-
- Vassilakos, T. N. y Athanassiou, C. G., 2013.** Effect of temperature and relative humidity on the efficacy of spinetoram for the control of three stored product beetle species. *J. of Stored Prod. Res.* 55, pp.73-77.
- Vota, M., 1957.** Preliminary study on storage of Emperor grapes in controlled atmospheres with and without sulphur dioxide fumigation. *Proc. Am. Soc. Hortic.Sci.* 69, 250-253.
- Wallace, H. A. H. y Sinha, R. N., 1981.** Causal factors operative in distributional patterns and abundance of fungi: A multivariate study. En: Wicklow D. T. y Carroll, G. C. (eds.). *The fungal community- Its Organisation and Role in Ecosystems.* Marcel Dekker Inc., New York, USA. pp. 233-247.
- Wang, A. J., Tsai, J. H., Ding, W., Zhao, Z., Wang, J. y Ding, W. E., 2001.** Toxic Effects of Six Plant Oils Alone and in Combination with Controlled Atmosphere on *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelididae). *J. of Econ. Entomol.* 94(5), 1296-1301.
- White, N. D. G., Jayas, D. S. y Muir, W. E., 1995.** Toxicity of carbon dioxide at biologically 11 producible levels to stored product beetles. *Environ. Entomol.* 24, 640-647.
- Williams, G. C., 1964.** The life-history of the Indian meal-moth, *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lep. Phycitidae) in a warehouse in Britain and on different foods. *Annals of Applied Biology.* 53(3), 459-475.
- Woltering, E. J., Janmaat, A. F. y de Kogel, W., 2003.** Use of controlled atmospheres to enhance essential oil fumigant toxicity against western flower thrips, *Frankiniella occidentalis*. En: Oosterhaven, J. y Peppelenbos, H. W. (eds.). *Proceedings of the 8th International controlled atmosphere research conference, Vols I y II.* Acta Horticulturae. 600, 155-159.
- Yokoyama, V. Y., Miller, G. T. y Crisosto, C. H., 1999.** Low temperature storage combined with sulphur dioxide slow release pads for quarantine control of omnivorous leafroller *Platynota stultana* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 92, 235-238.
- Yokoyama, V. Y., Miller, G. T. y Crisosto, C. H., 2001.** Pest response in packed table grapes to low temperature storage combined with slow-release sulfur dioxide pads in basic and large-scale tests. *J. Econ. Entomol.* 94, 984-988.
- Zardetto, S., 2005.** Effect of modified atmosphere packaging at abuse temperature on the growth of *Penicillium aurantiogriseum* isolated from fresh pasta. *Food Microbiology.* 22, 367-371.
- Zhou, S., Criddle, R. S. y Mitcham, E. J., 2001.** Metabolic response of *Platynota stultana* pupae under and after extended treatment with elevated CO₂ and reduced O₂ concentrations. *J. Insect Physiol.* 47, 401-409.

