



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 34 416 T2 2006.06.14**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 751 710 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 34 416.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/03572**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 914 153.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/025430**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.03.1995**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **28.09.1995**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.01.1997**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **31.08.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.06.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A01N 63/04 (2006.01)**

**A01N 25/00 (2006.01)**

**C12R 1/645 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

**210965 21.03.1994 US**

(73) Patentinhaber:

**University of Florida, Gainesville, Fla., US**

(74) Vertreter:

**Barz, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 80803 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**STIMAC, L., Jerry, Gainesville, US; PEREIRA, Roberto, Gainesville, US**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND FORMULIERUNGEN ZUR BEKÄMPFUNG VON SCHADINSEKTEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Gebiet der Erfindung

**[0001]** Diese Erfindung betrifft Verfahren und Formulierungen zur Verwendung bei der Bekämpfung von Küchenschaben und Ameisen-Ungeziefer.

## Hintergrund der Erfindung

**[0002]** Die Entwicklung von biologischen Kontrollmitteln als Alternativen zu chemischen Insektiziden für die Bekämpfung von wichtigen Ungezieferarten ist ein Gegenstand wachsenden Interesses. Bedenken bezüglich der Umwelt und der Einwirkung von schädlichen Substanzen in der Luft, der Nahrung und im Wasser auf Menschen haben die Gesetzgebung und Beschränkungen bezüglich der Verwendung von chemischen Pestiziden, insbesondere für Ungeziefer, das in städtischer Umgebung gefunden wird, vorangetrieben. Die Bekämpfung von Insekten-Ungeziefer in städtischen Bereichen ist hoch wünschenswert, aber die Einwirkung von chemischen Pestiziden im Haushalt und aus Rasen und Gärten ist für die Öffentlichkeit sehr bedenklich. Wenn sie eine Wahl hätten, würden die meisten Leute lieber eine nicht-toxische biologische Bekämpfung anstelle einer toxischen Chemikalie verwenden, um Insekten in städtischer Umgebung zu bekämpfen. Das Problem ist, dass sehr wenige biologische Alternativen zu chemischen Insektiziden im Handel und zur Verwendung durch die Öffentlichkeit verfügbar sind. Für das meiste Insekten-Ungeziefer, das in städtischer Umgebung bekämpft werden muss (Ameisen, Schaben, Termiten, Flöhe, Wespen usw.), gibt es kein biologisches Mittel, das im Handel als Produkt verfügbar ist.

**[0003]** Küchenschaben sind ein ernsthaftes Ungeziefer in städtischen Bereichen. Da Küchenschaben so eng mit Menschen verbunden sind und sich üblicherweise auf verderbenden Nahrungsmitteln, Krümeln oder Speiseresten ernähren und unhygienische Bereiche, wie Abwassersysteme und infizierte Tanks, frequentieren, führt ihre Anwesenheit zur Vermutung einer Bedrohung für die menschliche Gesundheit. Aus Küchenschaben, die in häuslichen Umgebungen oder um häusliche Umgebungen herum gesammelt wurden, sind pathogene Organismen isoliert worden; jedoch ist die Rolle von Küchenschaben als Überträger von Pathogenen kontrovers. Anders als viele blutsaugende Gliederfüßler, deren Futtermittelverhalten die direkte Übertragung von Pathogenen auf Menschen zum Ergebnis hat, weisen Küchenschaben das Potential auf, Pathogene indirekt über eine Kontamination von Nahrungsmitteln oder Gerätschaften, die zur Nahrungsmittelherstellung verwendet werden, zu übertragen. Es wurde demonstriert, dass Küchenschaben pathogene Bakterien einfach durch Marschieren über Kulturen erwerben, und gezeigt, dass diese Pathogene anschließend über das nor-

male Futtermittelverhalten der befallenen Küchenschaben auf Nahrungsmittel übertragen werden. Außer bakteriell verursachter Nahrungsmittelvergiftung und bakteriell verursachten Krankheiten wie Typhus und Ruhr sind viele andere menschliche Krankheiten und Erkrankungen mitgeteilt worden, die mit Mikroorganismen verbunden sind, die aus Küchenschaben isoliert wurden. Diese schließen Polio, Giardia-Infektion, Gehörgangsmykose, Pneumomykose und verschiedene Würmer, wie den Hakenwurm und den Bandwurm, ein.

**[0004]** Es ist bekannt, dass neben der möglichen Rolle von Küchenschaben als Überträgern von pathogenen Mikroorganismen die bloße Anwesenheit dieser Insekten auf andere Weise zu menschlicher Morbidität beiträgt. Der vielleicht tückischste Aspekt ist die psychologische Auswirkung dieses Ungeziefers in Form von Angst und Stress, die mit dem Befall in Beziehung stehen und in einigen Fällen pathologische Dimensionen annehmen können. Weiter können defensive Sekretionen unter Küchenschaben-Arten brennende Empfindungen, Schwindel oder Übelkeit in Individuen verursachen, die mit den Insekten in Kontakt kommen.

**[0005]** Derzeitige Küchenschaben-Bekämpfungsmethoden in Gebäuden umfassen vorbeugende und korrektive Ansätze. Vorbeugende Maßnahmen betonen die Hygiene, um Unterschlüpf- und Nahrungsquellen zu beseitigen, das Abdichten von Zugangswegen und die Schaffung von ungestörten Umgebungen durch die Anwendung von Borsäure oder sorbierendem Staub in Wandhohlräumen während des Baus (Ebeling, W. [1971] Ann. Rev. Entomol. 16:123–158; Ebeling, W. [1978] Urban Entomology, Berkeley: Univ. Calif. Div. Agric. Sci. 695 S.). Jedoch ist die Durchführung dieser Maßnahmen schwierig und beschränkt so ihre Wirksamkeit (Thoms, E.M., W.H. Robinson [1987] J. Econ. Entomol. 80:131–135). Korrektive Maßnahmen, die verwendet werden, um einen bestehenden Befall zu unterdrücken, betonen die Verwendung von Insektizid-Anwendungen. Eine üblicherweise verwendete Technik besteht darin, in festen Zeitabständen Insektizide mit langanhaltender Aktivität in Bereichen zu versprühen, die von Küchenschaben frequentiert werden (Schal, C., R.L. Hamilton [1990] Ann. Rev. Entomol. 35:521–551). Trotz der Kurzzeit-Unterdrückung von Küchenschaben-Populationen machen toxische Rückstände und die Entwicklung von Insektizid-Resistenz (Cochran, D.G. [1989] J. Econ. Entomol. 82:336–341) die vollständige Abhängigkeit von dieser Technik unerwünscht. Alternative korrektive Maßnahmen, wie das Aufstellen von Fallen mit toxischem Köder, können unter geeigneten Bedingungen für eine ausreichende Bekämpfung sorgen (Thoms und Robinson [1987], oben).

**[0006]** Die Verwendung von natürlichen Feinden für

die biologische Bekämpfung von Küchenschaben ist in variierenden Maßen überprüft worden. Obwohl Fallen, die Biokontrollmittel verwenden, vorgeschlagen worden sind, sind diese Fallen nur so gut wie das verwendete Biokontrollmittel. U.S. Patente Nr. 5,057,315 und 5,057,316. Feldfreisetzungen von Parasitoiden der amerikanischen und braungebänderten Küchenschabe hatten Parasitismus-Raten von so viel wie 95 % zum Ergebnis und haben etwas Optimismus bezüglich ihrer potentiellen Verwendung hervorgerufen (Coler, R.R., Van Driesche, R.G., Elkin-ton, J.S. [1984] *Environ. Entomol.* 13:603–606; Hagenbuch, B.E., R.S. Patterson, P.G. Koehler [1989] *J. Econ. Entomol.* 82:90–94). Pathogene Hefen, die aus Labor-Küchenschaben-Kolonien isoliert wurden, sind ebenfalls als mögliche biologische Kontrollmittel vorgeschlagen worden, aber es ist mehr Forschung erforderlich, um ihr Potential zu bewerten (Archbold, E.F., M.K. Rust, D.A. Reiersen [1987] *J. Med. Entomol.* 24:269–272; Archbold, E.F., M.K. Rust, D.A. Reiersen, K.D. Atkinson [1986] *Environ. Entomol.* 15:221–226; Verrett, J.M., K.B. Green, L.M. Gamble, F.C. Crochen [1987] *J. Econ. Entomol.* 80:1205–1212). Von zahlreichen anderen Pilzen, Bakterien, Protozoen und Nematoden ist berichtet worden, dass sie mit Küchenschaben verbunden sind, aber ihr Potential als biologische Kontrollmittel ist nicht signifikant oder nicht voll bewertet worden (Roth und Willis [1960] *Smithsonian Misc. Coll. Bd.* 141; Tsai, Y.H., K.M. Cahill [1970] *J. Parasitol.* 56:375–377; Zervos, S. [1983] *N. Z. J. Zool.* 10:329–334; Rahmet-Alla, M., A.F. Rowley [1989] *J. Invert. Path.* 53:190–196). So gibt es einen bedeutenden und seit langem bestehenden Bedarf an einem wirksameren und sicheren Mittel zur Bekämpfung von Küchenschaben.

**[0007]** Rossameisen, *Camponotus* spp., sind in ganz Nordamerika verteilt. Einige der üblicheren und/oder untersuchten Arten schließen *C. modoc* im pazifischen Nordwesten, *C. clarithorax* in Südkalifornien und *C. floridanus* in Florida ein. *C. pennsylvanicus*, *C. noveboracensis* und *C. abdominalis* werden im Osten gefunden (Ebeling, W. [1978] *Urban Entomology, Univ. Calif.: Berkeley* S. 209–213). Die öffentlichen Bedenken gegenüber Rossameisen sind aufgrund der größeren Wahrscheinlichkeit eines Gebäudebefalls gewachsen, da sich Vorstadt-Entwicklungen in die Wald-Aufenthaltsräume der Ameisen erstrecken.

**[0008]** Lästige Arten von Rossameisen können wegen ihrer futtersuchenden Aktivität innerhalb von Häusern als Plage-Ungeziefer angesehen werden. Ein signifikanter Schaden tritt auf, wenn Rossameisen ihre Nester in gesundes Holz ausdehnen. Nistorte können in lebenden und toten Bäumen vorhanden sein, was manchmal einen Schaden für schatten-spendende Bäume zur Folge hat. Nester können auch in Wänden und Trägerbalken von Bauwerken

oder in Hohlräumen innerhalb von Türen, Wänden und Möbeln errichtet werden. Eine Bevorzugung von feuchtem und vermoderndem Holz wurde mitgeteilt, aber Nistorte sind nicht auf derartige Bereiche beschränkt. Rossameisen-Populationen entwickeln sich relativ langsam, wobei bei verschiedenen Arten über einen Zeitraum von 2 Jahren oder länger Kolonien von 300–2.000 Arbeitern erzeugt werden. Die Anwesenheit von sich vermehrenden Tieren folgt dieser langsamen Entwicklung, da ihre Erzeugung nur aus gut etablierten Kolonien berichtet worden ist (Hansen, L.D., R.D. Akre [1985] "Biology of carpenter ants in Washington state (Hymenoptera: Formicidae: *Camponotus*)", *Melandria* 43: 62 S.; Pricer, J.L. [1908] *Biol. Bull.* 14:177–218). Trotz des langsamen Kolonienwachstums sind große Kolonien mit Satelliten-Kolonien gefunden worden. Es findet eine Arbeiterbewegung zwischen der Hauptkolonie und den Satelliten statt, die als Gebiete für eine weitere Brutentwicklung und Kolonienexpansion dienen (Hansen und Akre [1965], oben).

**[0009]** Derzeitige Verfahren zur Bekämpfung eines Gebäude-Befalls mit Rossameisen umfasst die Sanierung von potentiellen und vorhandenen Nestorten, die Minimierung des Zugangs zu Bauten (z.B. die Verhinderung des Kontakts von Baumzweigen mit einem Gebäude), die Anwendung von Insektiziden, um Rossameisen abzuschrecken (Umkreis-Sprühbarrieren) und/oder zu eliminieren. Es wird berichtet, dass die Verwendung von Borsäure-Staub in trockenen Wandhohlräumen bis zu 20 Jahre wirksam ist (Hansen und Akre, oben).

**[0010]** Empfehlungen für die chemische Bekämpfung eines bestehenden Gebäudebefalls im Haus sind häufig von Warnungen über mögliche Gefährdungen des Anwenders sowie von Kindern und Haustieren begleitet. Alternative Kontrollverfahren, wie wirksame biologische Kontrollmittel, sind nicht gefunden worden (Akre, R.D., L.D. Hansen, A.L. Antonelli [1989] *Ext. Bull. Washington State Univ. Coop. Ext. Serv.* 1989 Rev. Nr. EB 0181, 6 S.). Es besteht ein klarer Bedarf an einem sicheren, wirksamen biologischen Kontrollmittel für Rossameisen.

**[0011]** Pharao-Ameisen, *Monomorium pharaonis*, sind als "die am hartnäckigsten und am schwierigsten zu kontrollierenden oder auszurottenden aller Häuser befallenden Ameisen" beschrieben worden (Smith, M.R. [1965] *USDA-ARS Tech. Bull.* Nr. 1326, 105 S.). Es ist eine tropische Art, die ihren Bereich in gemäßigte Regionen durch Errichten von Kolonien in geheizten Gebäuden ausgedehnt hat. Pharao-Ameisen befallen häufig Gebäude, in denen Nahrung hergestellt wird, und es wurde gefunden, dass sie pathogene Organismen tragen (Beatson, S.H. [1972] *Lancet* 1:425–427).

**[0012]** Die Schwierigkeit bei der Bekämpfung von

Pharao-Ameisen kann deren unzugänglichen Nistorten, dem raschen Populationswachstum und der Verstreuung der Kolonien zugeschrieben werden. Ihre geringe Größe ermöglicht die Errichtung von Kolonien an jedem geeigneten Ort, einschließlich ungewöhnlicher Stellen, wie zwischen Büchern und aufbewahrter Kleidung. Bei Kolonien mit mehreren Königinnen und den warmen (30°C), feuchten (63–80 % RF) Bedingungen, die Pharao-Ameisen begünstigen, können sich rasch große Kolonien entwickeln. Teile dieser großen Kolonien können sich zu jedem Zeitpunkt unter Bildung neuer Kolonien verteilen, wahrscheinlich als Reaktion auf eine Überfüllung und ungünstige Mikroumgebungsbedingungen. Anders als andere Ameisenarten zeigen Pharao-Ameisen keine Aggression unter Kolonien. Dies ermöglicht die Aufnahme von Ameisen aus anderen Kolonien und kann weiter die Errichtung von neuen Kolonien und einen Wiederbefall verstärken. Pharao-Ameisen suchen auch mehr als 35 m vom Nest entfernt nach Nahrung, ohne dass sie einem speziellen Pfad folgen, und machen es so schwierig, Nester zu finden und auszuroten.

**[0013]** Kontrollverfahren für Pharao-Ameisen betonen die Verwendung von Insektenwachstumsregulatoren (IGR) oder toxischen Stoffen, die Ködern einverleibt werden. Richtig durchgeführte Köderprogramme sind wirksam, aber es kann über einen Monat dauern, um eine Bekämpfung zu erzielen. Insektizid-Anwendungen beseitigen gewöhnlich die Kolonien nicht, obwohl sie schnellwirkend sind, und können in gewissen Bereichen, in denen toxische Rückstände bedenklich sind, unannehmbar sein. Zusätzlich sind Insektizid-Anwendungen im Allgemeinen nicht mit Köderprogrammen kompatibel. Es gibt einen Bedarf an sicheren und wirksamen biologischen Kontrollmitteln für Pharao-Ameisen.

**[0014]** Die US-A-4925663 offenbart einen Pilz, der eine hohe Aktivität gegen Feuerameisen zeigt. Dieses Isolat, das als *Beauveria bassiana*-Isolat Nr. 447 bezeichnet wird, ist bei der American Type Culture Collection hinterlegt worden und weist die Zugangsnummer ATCC 20872 auf (Hinterlegungsdatum 29. Dezember 1987).

**[0015]** Die WO-A-90/10389 und Chemical Abstracts (1969) 70(11), Abstract 46398j, offenbaren, dass *B. bassiana*-Stämme verwendet werden können, um Schaben bzw. Pharao-Ameisen zu kontrollieren.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0016]** Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung umfasst ein Verfahren zur Bekämpfung von Küchenschaben, Rossameisen oder Pharao-Ameisen das Aufbringen des *Beauveria bassiana*-Isolats ATCC 20872 auf die Küchenschaben, Rossameisen bzw. Pharao-Ameisen oder ihre Umgebung. Das fun-

gale Biopestizid kann auf das gegebene Ungeziefer an jedem seiner normalen Aufenthaltsorte aufgebracht werden. Der Pilz kann zum Beispiel direkt auf das Ungeziefer, in Schalen, auf seine Umgebung oder auf jeden Ort aufgebracht werden, an dem dieses Ungeziefer ein Problem ist.

**[0017]** Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung umfasst eine Zusammensetzung zur Bekämpfung eines Küchenschaben- oder Ameisen-Ungeziefers eine Nahrungsquelle und das oben definierte Isolat, wobei die Zusammensetzungen in Form eines trockenen Pulvers vorliegt, das durch ein 65 US-Mesh-Sieb treten kann. Diese Formulierung schreckt Feuerameisen und anderes Ungeziefer nicht ab. Diese Entdeckung ist unerwartet, da es bekannt ist, dass Ungeziefer durch viele Formulierungen von mikrobiellen Mitteln abgeschreckt werden.

#### Beschreibung der Erfindung

**[0018]** Der entomopathogene Pilz *Beauveria bassiana* ist ein imperfekter Pilz (Fungi Imperfecti) in der Unterordnung Deuteromycotonia. Die Gattung *Beauveria* Vuill liegt innerhalb der Klasse Deuteromycetes und unterscheidet sich von anderen Gattungen dadurch, dass sie Conidien aufweist, die einzeln, nicht kettenförmig geboren werden und dass der fruchtbare Teil des Conidiophors in Zick-Zack-Form vorliegt und an der Spitze ausgezogen ist. Die Art *Beauveria bassiana* hat kugelförmige, nicht ellipsoidförmige Conidien, die Abmessungen von 2–3 µm auf 2–2,5 µm aufweisen, und die Conidiophoren bilden dichte Büschel.

**[0019]** Damit ein biologisches Kontrollmittel in einer praktikablen Menge zur Bekämpfung von Küchenschaben, Rossameisen und Pharao-Ameisen wirksam ist, ist es wesentlich, dass das Mittel eine Pathogenität gegen dieses Ungeziefer aufweist und dass es auch virulent ist. Je virulenter es ist, desto besser ist es als Biokontrollmittel. Obwohl gezeigt worden ist, dass einige Pilz-Isolate etwas Pathogenität gegenüber diesem Ungeziefer aufweisen, wiesen diese Isolate nicht die wesentliche Virulenz auf, um als Biokontrollmittel zu wirken. Es gibt keinen bekannten Weg, ein pathogenes nicht-virulentes Pilz-Isolat in ein pathogenes virulentes Isolat zu überführen. So erreicht die Entdeckung des neuen Isolats der Erfindung ein Ziel, nach dem lange gesucht worden ist.

**[0020]** Wirkungsweise und Virulenz. Wie die meisten entomogenen Pilze initiiert *Beauveria bassiana* eine Infektion durch eine keimende Spore (Conidie), die an der Kutikula des Insektenwirts haftet und diese anschließend penetriert. Vorteilhaft und unerwartet haften die beanspruchten *Beauveria bassiana*-Isolate sehr fest an der Kutikula von Küchenschaben und Ameisen und werden typisch nicht durch die Putzaktivitäten des Insekts entfernt. Dies kann der hohen Vi-

rulenz des Pilzes etwas Rechnung tragen. Wenn der Pilz die Kutikula des Insekts penetriert, beginnen die invasiven Hyphen in die Wirtsgewebe einzutreten und sich durch das Haemocoel zu verzweigen. Die hyphalen Körper oder Segmente der Hyphen verteilen sich im ganzen Haemocoel, wobei sie das sterbende Insekt mit Myzelien ausfüllen. Emergenz-Hyphen wachsen durch das Integument des Insekts heraus und produzieren Sporen auf der äußeren Oberfläche des Wirts. Diese Sporen oder Conidien werden verstreut und können neue Wirtsinsekten infizieren. B. bassiana-Sporen können durch die Aktivitäten des Ungeziefers innerhalb des Nests verstreut werden.

**[0021]** Formulierungen. Es wurde gefunden, dass die Formulierungen der vorliegenden Erfindung besonders wirksam für die Bekämpfung von Feuermotten und anderem Ungeziefer sind. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Formulierung ein trockenes Pulver mit einem fungalen Biokontrollmittel und einer Nahrungskomponente. Bevorzugt umfasst die Formulierung weiter ein Trocknungsmittel. Gegebenenfalls kann die Formulierung auch einen Lockstoff enthalten. Die bevorzugte Formulierung ist nicht abschreckend und schließt eine Nahrungsquelle ein, so dass das Ziel-Ungeziefer die Nahrung aufnimmt und andere Nestgenossen für eine Nahrungsaufnahmeaktivität rekrutiert. Weiter wurde gefunden, dass die Formulierung der vorliegenden Erfindung vorteilhaft am Körper des Ziel-Ungeziefers haftet, wodurch die Besiedelung des Ungeziefers durch das fungale Biokontrollmittel erleichtert wird. Die Fähigkeit, an dem Ungeziefer zu haften, unterscheidet die Formulierung der vorliegenden Erfindung sehr deutlich von anderen Formulierungen, die derzeit verwendet werden, um chemische Pestizide zu verabreichen.

**[0022]** In einer Ausführungsform besteht die Formulierung der vorliegenden Erfindung aus 25–40 % Ernussmaterial, 45–60 % Maisstärke, 2–20 % fungalem Biokontrollmittel und 0–15 % Trocknungsmittel. In einer speziellen Ausführungsform kann die Formulierung etwa 35 % Ernussmaterial, etwa 50 % Maisstärke, etwa 5 % Trocknungsmittel und etwa 10 % Pilz umfassen. Bei dem Trocknungsmittel kann es sich um irgendeines der vielen dem Fachmann bekannten Materialien handeln, die kleine Teilchen sind, aber ein hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis aufweisen, um wirksam Wasser oder Öle aus der Formulierung zur Schaffung eines trockenen Pulvers zu entfernen. Bevorzugt kann das Trocknungsmittel Diatomeenerde oder ein synthetisches Calciumsilicat, wie Micro-Cel<sup>®</sup>, sein.

**[0023]** Die Erdnuss-Komponente der Formulierung wird bevorzugt durch Mahlen von gerösteten Erdnüssen hergestellt, um ein Pulver zu erhalten. Um ein trockenes Pulver zu erzielen, ist es am besten, die

Erdnüsse zusammen mit der Maisstärke und/oder einem Trocknungsmittel zu mahlen. Bevorzugt sind die Komponenten der Formulierung kleine Teilchen und treten durch ein 60 Mesh-Sieb. Typisch treten die Maisstärke und das Trocknungsmittel durch ein viel kleineres Sieb, wie mit 300 Mesh. Bevorzugt ist die Formulierung ein Pulver, das rieselfähig ist und nicht in Klumpen zusammenklebt. Nahrungsquellen außer dem Erdnuss-Material oder der Maisstärke können gemäß der vorliegenden Erfindung ebenfalls verwendet werden. Die Wahl einer Nahrungsquelle hängt von dem speziellen Ungeziefer ab, welches das Ziel für die Bekämpfung ist. Auch können verschiedene, dem Fachmann bekannte Lockmittel verwendet werden. Bei diesen Lockmitteln kann es sich zum Beispiel um Pheromone oder verschiedene Extrakte handeln.

**[0024]** Um die Bekämpfung zu bewerten, die unter Verwendung der Materialien und Verfahren der vorliegenden Erfindung erzielt wird, wurden Tests durchgeführt, um die erzielte Bekämpfung von Ungeziefer mit gewissen kommerziellen Pestiziden zu vergleichen. Wie nachstehend beschrieben, demonstrierten diese Tests, dass die Pilz-Formulierungen der vorliegenden Erfindung bei der Bekämpfung von Ungeziefer hoch wirksam sind.

**[0025]** Es folgen Beispiele, welche Verfahren, einschließlich der besten Weise, zur Durchführung der Erfindung erläutern. Diese Beispiele sollten nicht als beschränkend angesehen werden. Alle Prozentsätze sind auf Gewicht bezogen, und alle Lösungsmittelmischungsverhältnisse sind auf Volumen bezogen, falls nicht anders angegeben.

#### Beispiel 1 – Herstellung des Pilzes

**[0026]** Der vorliegende Pilz kann in Schalen mit einem Medium auf Reis-Basis erzeugt werden. Ein Isolat von Pilz-Inokulum wird verwendet, um das Wachstum des Pilzes in den Schalen zu initiieren.

**[0027]** Das anfängliche Inokulum wird in Petri-Schalen hergestellt. Die reinen Sporen werden dann in Gläser überführt, die sterilen weißen Reis ohne Schalen enthalten.

**[0028]** Das Medium für die Schalen wird wie folgt hergestellt:

1. Der Reis wird 10 Minuten vorgekocht.
2. 750 Gramm gekochter Reis werden in Polyethylen-Beutel gegeben und 30 Minuten in einem Autoklaven bei 120°C sterilisiert.
3. Innerhalb eines Abzugs mit laminarem Strom wird ein Teelöffel Sporen und Reis aus den Inokulum-Gläsern zu jedem Beutel mit hergestelltem sterilem Medium gegeben.
4. Jeder Beutel wird durch Falten und Verklammern des offenen Endes dicht verschlossen.

5. Die Beutel werden in einen sterilen Raum mit positivem Druck, einer Temperatur bei 25,0–27,0°C, relativer Feuchtigkeit über 70 % und 16 Stunden Lichtzeit überführt. Dieser Raum ist als der "Umgebungsraum" bekannt.

**[0029]** Nach 3 Tagen im Umgebungsraum werden Beutel, die Myzelien enthalten, ausgewählt, und ihr Inhalt wird in Kunststoffschalen überführt. Die Größe der Schalen ist derart, dass jede Schale den Inhalt von 2–3 Beuteln unterbringt. Die Schalen und ihr Inhalt werden 12–15 Tage in dem Umgebungsraum gelassen. Am Ende der 12–15-tägigen Zeitspanne werden die Schalen in einen Raum mit einer kühlen (10–20°C) Strom reiner Luft überführt. Die Schalen werden in diesem Raum gelassen, bis die kühle Luft die Reis- und Pilz-Mischung getrocknet hat.

**[0030]** Die unkontaminierten Schalen mit durch Pilz bedecktem Reis können geerntet und für die Anwendung oder Lagerung präpariert werden. Wenn der Pilz nicht innerhalb von 1–2 Wochen nach der Erzeugung auf Küchenschaben oder Ameisen aufgebracht wird, können die Conidien durch Schütteln und Sieben gesammelt werden. Das resultierende Pulver enthält Sporen und einige Myzelien und kann direkt auf Ziel-Insekten aufgebracht oder verwendet werden, um eine Formulierung als Flüssigkeit, Pulver oder Köder herzustellen.

**[0031]** Wenn der Pilz aufzubewahren ist, kann die Mischung mit Maisstärke oder Talkum gemischt und in sterile Kunststoffbehälter gegeben werden, die dicht verschlossen und in einem Kühlschrank bei 4°C oder in einem Raum mit einem Temperaturbereich von 10–25°C ohne direktes Sonnenlicht aufbewahrt werden. Die hohe Virulenz von *B. bassiana* kann durch bakterielle oder fungale Kontamination beeinträchtigt werden. Deshalb muss man während der ganzen Herstellung des Pilzes große Sorgfalt walten lassen, um die Sterilität aller Instrumente und der ganzen Ausrüstung beizubehalten.

**[0032]** Wie die folgenden Beispiele demonstrieren, kann das Pilz-haltige Produkt auf Ziel-Ungeziefer und seine Nester als Flüssigkeit, Pulver aufgebracht oder als Falle mit Köder aufgestellt werden, damit die Ungeziefer das Futter aufnehmen, infiziert werden und Inokulum zurück zum Nest tragen.

#### Beispiel 2 – Sprühauftragung

**[0033]** Für die Behandlung einzelner Ameisen oder Küchenschaben oder kleiner Gruppen dieses Ungeziefers kann ein Besprühen verwendet werden. Ein Pilz-Suspension, die  $1,0 \times 10^7$  bis  $1,0 \times 10^9$  Sporen pro Milliliter Wasser enthält, kann unter Verwendung einer Spritzpistole oder eines anderen Mittels als Applikator auf das Ziel-Ungeziefer aufgesprüht werden.

#### Beispiel 3 – Pulver-Anwendung

**[0034]** Eine Pilz-Sporen- und -Myzelien-Mischung kann mit Maisstärke oder Talkum gemischt und als trockenes Pulver auf die Umgebung des Ungeziefers aufgebracht werden.

**[0035]** Das Pulver wird wie im vorstehenden Beispiel 1 hergestellt. Das gesiebte *B. bassiana*-Pulver, das Reis, Sporen und Myzelien enthält, wird mit Maisstärke oder Talkum gemischt. Die Aufbringung dieses Pulvers auf die Nester oder direkt auf das Ungeziefer kann ein rasches und weit verbreitetes Pilzwachstum innerhalb des Nests oder auf dem Ungeziefer erleichtern.

**[0036]** Die Auftragung kann unter Verwendung eines Druckluft-Applikators mit einer Zusatzeinrichtung bewerkstelligt werden, welche die Mischung in Risse und Spalten eines von Ungeziefer befallenen Gebäudes verteilt. Während und nach der Aufbringung wird das Ungeziefer, das mit weißem Pulver bedeckt ist, beobachtet. Dieses infizierte Ungeziefer stirbt innerhalb von 1–5 Tagen, und die Sporen, welche es produziert, sind für anderes Ungeziefer infektiös. Es sollte eine deutliche Aktivitätsabnahme innerhalb von 1–3 Tagen stattfinden, und der Tod sollte innerhalb 1–2 Wochen nach der Aufbringung eintreten. Aktive Sporen verbleiben in der Umgebung am Nestort, wodurch Inokulum bereitgestellt wird, um andere Schaben oder Ameisen zu infizieren.

#### Beispiel 4 – Köderfallen-Anwendung

**[0037]** Das Pilz-Pulver kann in einer Falle verwendet werden, in der die Eintrittswege mit Pilz-Inokulum bestreut sind. Vorzugsweise werden Pilzsporen verwendet. Ein Köder-Lockmittel, das in der Falle enthalten ist, wird von den Küchenschaben oder Ameisen gefressen, und die Futteraufnahme werden infiziert. Diese infizierten Individuen kehren kontaminiert in das Nest zurück und führen dadurch die Pilz-Krankheit in das Nest ein. Ein Pflanzenöl oder eine andere flüssige Substanz kann einem Köder in der Falle zugesetzt werden, um ihn für das Ungeziefer attraktiver zu machen. Verschiedene Lockmittel, einschließlich Pheromon-Verbindungen, sind dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt. Die Köderfallen sollten in Vitrinen, entlang Wandleisten, Fenstersimsen usw. aufgestellt werden. Eine Menge von 0,5 bis 2,0 Gramm Pilz-Mischung, die Sporen und Myzelien enthält, sollte in jeder Falle enthalten sein. Die in einem Bereich verwendete Anzahl von Fallen hängt vom Maß des Befalls ab.

#### Beispiel 5 – Behandlung von Rossameisen mit *B. bassiana* Nr. 447

**[0038]** Rossameisen (*Camponotus floridanus*) wurden *Beauveria bassiana* Nr. 447 ausgesetzt. Jede

Behandlung beinhaltete das Einwirkenlassen von Conidien der Isolate auf zwei Gruppen von jeweils 50 Ameisen. Die Ameisen wurden mit einer Conidien/Stärke-Mischung beschichtet, indem man die Ameisen und Sporen zusammen in einem bedeckten Behälter sanft schüttelte. Die Kontrollbehandlung bestand lediglich aus Maisstärke. Die Ameisen wurden anschließend in offenen Kunststoffkästen gehalten, die eine Nestzelle (bedeckte 100 mm-Petri-Schale, wobei die Bodenschale mit Mörtel gefüllt war, welcher periodisch mit Wasser befeuchtet wurde) und Honigwasser als Nahrung enthielt.

**[0039]** Die Mortalität wurde 18 Tage lang beginnend mit dem zweiten Tag nach der Einwirkung aufgezeichnet. Der Test wurde nach 28 Tagen beendet. Tote Ameisen wurden einzeln unter hoher Feuchtigkeit gehalten und bezüglich Sporulation überprüft, um die Infektionsraten zu bestimmen.

**[0040]** Rossameisen, die Isolate von *B. bassiana* ausgesetzt wurden, erlitten über 95 % Mortalität ([Fig. 1](#)). Mindestens 49 % der toten Ameisen entwickelten sporenbildende Körper der Pilze, denen sie ausgesetzt waren, was anzeigte, dass diese Isolate auf Rossameisen wachsen und sich vermehren können.

Beispiel 6 – Behandlung von Pharao-Ameisen mit *B. bassiana* Nr. 447

**[0041]** Pharao-Ameisen wurden einer Mischung ausgesetzt, die *B. bassiana* Nr. 447-Conidien als aktiven Bestandteil umfasste. Drei Kolonien von etwa 100–200 Ameisen wurden in einer Petri-Schale einzeln mit den Conidien bestäubt und in eine Nestzelle (15 × 40 mm-Kunststoff-Petri-Schale mit einem mit Mörtel gefüllten Boden und Eingangslöchern im Deckel) krabbeln gelassen. Bekämpfungen, die aus drei Kolonien bestanden, wurden nicht bestäubt. Die Ameisen-Kolonien wurden getrennt in größeren Petri-Schalen zusammen mit den Nestzellen und Honigwasser gehalten. Die Mortalität wurde 25 Tage lang aufgezeichnet. Tote Ameisen wurden individuell oberflächensterilisiert und unter hoher Feuchtigkeit gehalten, um die Infektion einzustufen.

**[0042]** Die Einwirkung von *B. bassiana* 447 auf Pharao-Ameisen hatte nach 8 Tagen eine 90 %-ige Mortalität zum Ergebnis ([Fig. 2](#)). Weiter wurde bestätigt, dass alle toten Ameisen Pilzsporen aufwiesen, was anzeigte, dass sich der Pilz erfolgreich auf Pharao-Ameisen entwickeln kann.

Beispiel 7 – Behandlung von Küchenschaben mit *b. bassiana* Nr. 447

**[0043]** *B. bassiana* Nr. 447 wurde bei der deutschen Küchenschabe (*Blattella germanica*) bezüglich der Fähigkeit ihrer Conidien getestet, den Wirt zu infizie-

ren und zu töten. Gruppen von 50 männlichen Küchenschaben wurden mit CO<sub>2</sub> anästhesiert und dann innerhalb eines bedeckten Behälters von 227 g (8 oz) mit Conidien bestäubt. Kontrollen bestanden aus einer Gruppe von 20 Küchenschaben. Die bestäubten Küchenschaben wurden einzeln in getrennte Petri-Schalen (10 × 35 mm) überführt, welche befeuchtetes Filterpapier enthielten. Die Sterblichkeit wurde ab dem zweiten Tag nach der Conidien-Aufbringung und täglich danach aufgezeichnet. Tote Küchenschaben wurden einzeln 10 Tage lang in einer Feuchtigkeitskammer gehalten, um sporenbildende Pilze zu identifizieren.

**[0044]** Bei der amerikanischen Küchenschabe, *Periplaneta americana*, wurde *B. bassiana* Nr. 447 durch Aufpinseln der Conidien auf anästhesierte Küchenschaben aufgebracht. Die Küchenschaben wurden bei 26°C in Petri-Schalen gehalten, wie oben beschrieben.

**[0045]** In dem Test mit deutschen Küchenschaben verursachte das Pilz-Isolat *B. bassiana* Nr. 447 ([Fig. 3](#)) eine 100 %-ige Mortalität nach Kontakt mit Sporen. Die Sporulation des Pilzes war auf 82 % der toten Küchenschaben sichtbar. Bei der Einwirkung auf die amerikanischen Küchenschaben verursachte das *B. bassiana*-Isolat nach 8 Tagen eine Mortalität von 90 % oder mehr ([Fig. 4](#)). Die Pilz-Sporulation trat bei allen toten amerikanischen Küchenschaben auf.

Beispiel 8 – Bewertung von *B. bassiana*-Köderformulierungen für die Bekämpfung von Feuerameisen

**[0046]** Köderformulierungen mit gemahlenem Erdnussmaterial wurden Kolonien von Feuerameisen-Arbeitern in Kunststoffkästen (≈ 20 × 12 × 10 cm) angeboten, welche eine kleine Wasserschale und eine Kunststoff-Petri-Schale (60 mm Durchmesser) enthielten, die als Nestzelle diente. Die Kolonien wurden 2–4 Tage vor Beginn des Experiments zusammengestellt, um zu ermöglichen, dass sich die Ameisen an ihre neue Umgebung anpassten. Die Formulierungen (0,5 g) wurden auf Wägebapieren mit einer Fläche von 635 mm<sup>2</sup> (1 Quadratinch) oder kleinen Schalen angeboten und 3–4 Tage in den Kästen gelassen. Zwei Kontrollen wurden verwendet: eine saubere Bekämpfung, die keine Formulierung, sondern nur Wasser erhielt, und eine Köder-Bekämpfung, welche die Köder-Formulierung ohne jeglichen Pilz erhielt. Bei dem Pilz-Isolat, das etwa 10 % *B. bassiana* Nr. 447 enthielt, wurde 14 Tagen nach der Behandlung eine nach Abbott korrigierte Mortalität von mehr als 70 % beobachtet.

Beispiel 9 – Chemische Köder aus Fallen im Vergleich zu Pilz-Formulierungen für die Bekämpfung von Feuerameisen

**[0047]** Die chemischen Köder, die verglichen wur-



den, stammen aus: MAX-Ameisenfalle, RAID-Ameisenfalle und COMBAT-Ameisenfalle. Die chemischen Köder wurden aus den Fallen entfernt und Ameisen auf Papier angeboten. Die Bekämpfung empfing die gleiche Formulierung wie die Pilz-Behandlung, aber ohne Conidien. Die Pilz-Formulierung enthielt Erdnussmaterial und Maisstärke und 10 % Conidien von *B. bassiana* Nr. 447. MAX und die Pilz-Formulierungen wiesen eine ähnliche Mortalität auf, obwohl MAX bewirkte, dass die Mortalität viel schneller als beim Pilz zunahm, wie erwartet, da der Pilz 3–4 Tage benötigt, um die Insekten zu infizieren und zu töten. Wie in [Fig. 5](#) gezeigt, waren COMBAT und RAID weniger wirksam als MAX und *Beauveria bassiana*.

Beispiel 10 – Chemische Köder aus Fallen im Vergleich zu Pilz-Formulierungen für die Bekämpfung von Pharao-Ameisen

**[0048]** Die chemischen Köder, die verglichen wurden, stammen aus: MAX-Ameisenfalle, RAID-Ameisenfalle und COMBAT-Ameisenfalle. Die chemischen Köder wurden aus den Fallen entfernt und Ameisen auf Papier angeboten. Die Bekämpfung empfing die gleiche Formulierung wie die Pilz-Behandlung, aber ohne Conidien. Die Pilz-Formulierung enthielt Erdnussmaterial und Maisstärke und 10 % Conidien von *B. bassiana* Nr. 447. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in [Fig. 6](#) gezeigt.

Beispiel 11 – Chemische Köder aus Fallen im Vergleich zu Pilz-Formulierungen für die Bekämpfung von "Crazy Ants" [*Paratrechina longicornis*]

**[0049]** Die chemischen Köder, die verglichen wurden, stammen aus: MAX-Ameisenfalle, RAID-Ameisenfalle und COMBAT-Ameisenfalle. Die chemischen Köder wurden aus den Fallen entfernt und Ameisen auf Papier angeboten. Die Bekämpfung empfing die gleiche Formulierung wie die Pilz-Behandlung, aber ohne Conidien. Die Pilz-Formulierung enthielt Erdnussmaterial und Maisstärke und 10 % Conidien von *B. bassiana* Nr. 447. In allen Experimenten bewirkte der Köder mit *Beauveria bassiana* eine ähnliche oder größere Mortalität als diejenige, die von chemischen Ködern bewirkt wurde. Siehe [Fig. 7](#) bezüglich der Ergebnisse eines derartigen Experiments.

Beispiel 12 – Chemische Köder aus Fallen im Vergleich zu Pilz-Formulierungen für die Bekämpfung von Rossameisen

**[0050]** Die chemischen Köder, die verglichen wurden, stammen aus: MAX-Ameisenfalle, RAID-Ameisenfalle und COMBAT-Ameisenfalle. Die chemischen Köder wurden aus den Fallen entfernt und Ameisen auf Papier angeboten. Die Bekämpfung empfing die gleiche Formulierung wie die Pilz-Be-

handlung, aber ohne Conidien. Die Pilz-Formulierung enthielt Erdnussmaterial und Maisstärke und 10 % Conidien von *B. bassiana* Nr. 447. Wie aus [Fig. 8](#) ersichtlich ist, wies die Pilz-Formulierung eine ähnliche oder leicht bessere Leistung als MAX- und RAID-Köder und eine nur etwas geringere als COMBAT auf. Die Wirkungen von sowohl COMBAT als auch des Pilzes waren mit Bezug auf RAID und MAX verzögert, aber die Verzögerung der Pilz-Wirkung ist länger als diejenige von COMBAT.

Beispiel 13 – Feldpestizide im Vergleich zu Pilz-Formulierungen für die Bekämpfung von Feuerameisen

**[0051]** Chemische AMDRO®-Köder wurden bewertet. Der Köder in einem Experiment wies auch 10 % ACEPHATE-Feuerameisen-Pulver-Insektizid auf. Bei jeder Behandlung wurde ein halbes Gramm Formulierung pro Schauplatz auf Wägebapier bereitgestellt. Die Formulierung wurde nach 4 Tagen entfernt. Die Bekämpfung empfing die gleiche Formulierung wie die Pilz-Behandlung, aber ohne Conidien. Die Pilz-Formulierung enthielt Erdnussmaterial, Maisstärke und 10 % Conidien von *B. bassiana* Nr. 447.

**[0052]** ACEPHATE (welches normalerweise keine Köder-Formulierung ist) tötet die Ameisen nahezu sofort. Die Mortalität mit AMDRO nimmt weniger rasch zu, aber am Tag 4 waren  $\approx 80\%$  der Population tot. Die Mortalität mit Pilz nimmt mit einer langsameren Geschwindigkeit zu, aber die End-Mortalität nach 2–4 Wochen ist ähnlich derjenigen, die mit den chemischen Pestiziden erhalten wird ([Fig. 9](#)).

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Bekämpfung von Küchenschaben, welches umfasst das Aufbringen von *Beauveria bassiana*-Isolat Nr. 447 mit den Merkmalen von ATCC 20872 auf die Küchenschaben oder ihre Umgebung.

2. Verfahren zur Bekämpfung von Holzameisen, welches umfasst das Aufbringen von *Beauveria bassiana*-Isolat Nr. 447 mit den Merkmalen von ATCC 20872 auf die Holzameisen oder ihre Umgebung.

3. Verfahren zur Bekämpfung von Pharao-Ameisen, welches umfasst das Aufbringen von *Beauveria bassiana*-Isolat Nr. 447 mit den Merkmalen von ATCC 20872 auf die Pharao-Ameisen oder ihre Umgebung.

4. Zusammensetzung für die Bekämpfung von Küchenschaben- oder Ameisen-Ungeziefer, welche eine Nahrungsquelle und das in Anspruch 1 definierte Isolat umfasst, wobei die Zusammensetzung in Form eines trockenen Pulvers vorliegt, das durch ein 65 US Mesh-Sieb passieren kann.



5. Zusammensetzung nach Anspruch 4, die ein Erdnussmaterial, Maisstärke und das Isolat umfasst.

6. Zusammensetzung nach Anspruch 4 oder Anspruch 5, die weiter ein Trocknungsmittel umfasst.

7. Zusammensetzung nach Anspruch 5 oder Anspruch 6, die 25–40 % Erdnussmaterial, 45–60 % Maisstärke, 0–15 % Trocknungsmittel und 2–20 % des Isolats umfasst.

8. Zusammensetzung nach Anspruch 7, die 30–40 % Erdnussmaterial, 45–55 % Maisstärke, etwa 10 % Trocknungsmittel und etwa 10 % des Isolats umfasst.

9. Zusammensetzung nach Anspruch 7, die etwa 35 % Erdnussmaterial, etwa 50 % Maisstärke, etwa 5 % Trocknungsmittel und etwa 10 % des Isolats umfasst.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

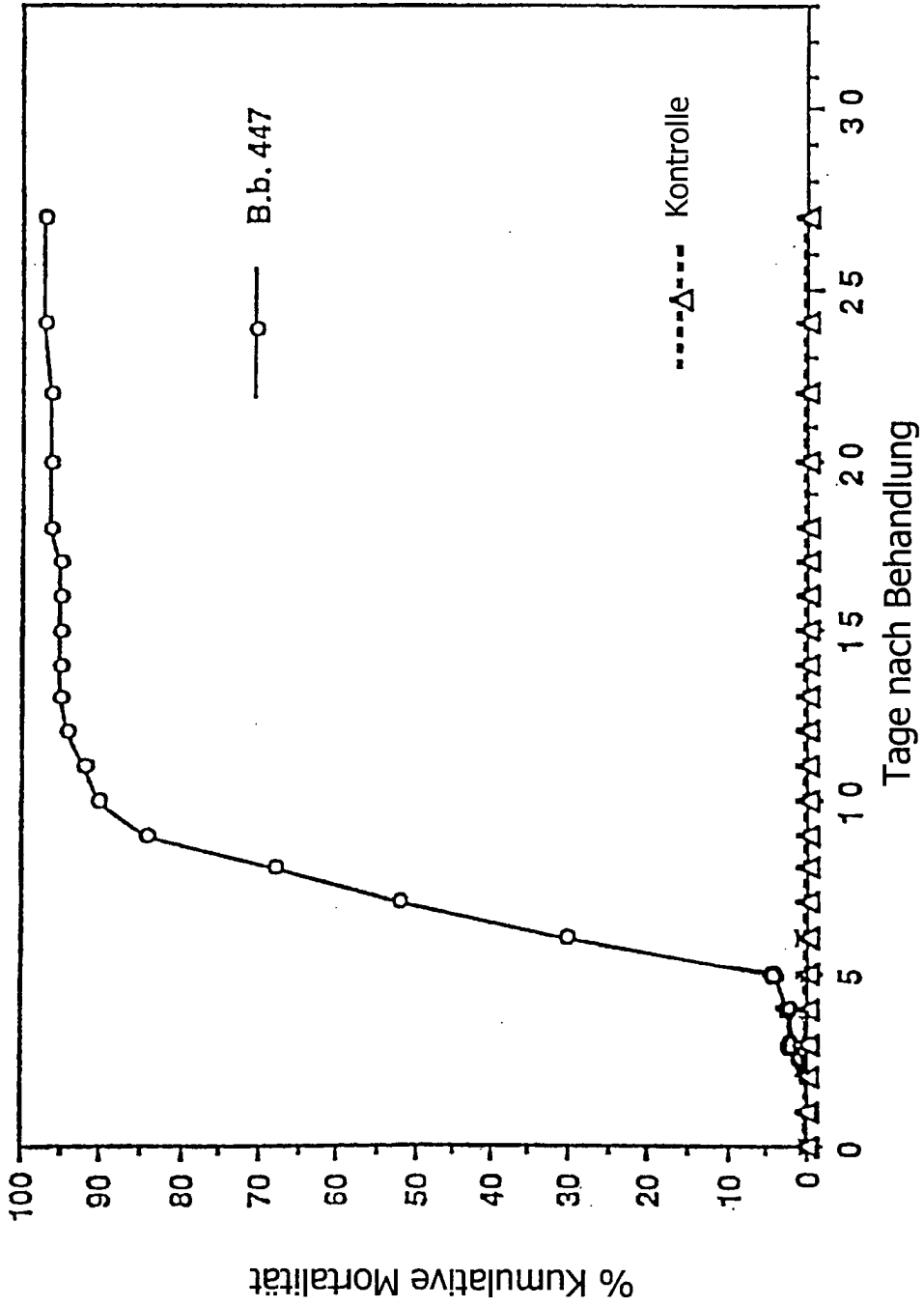


Fig. I

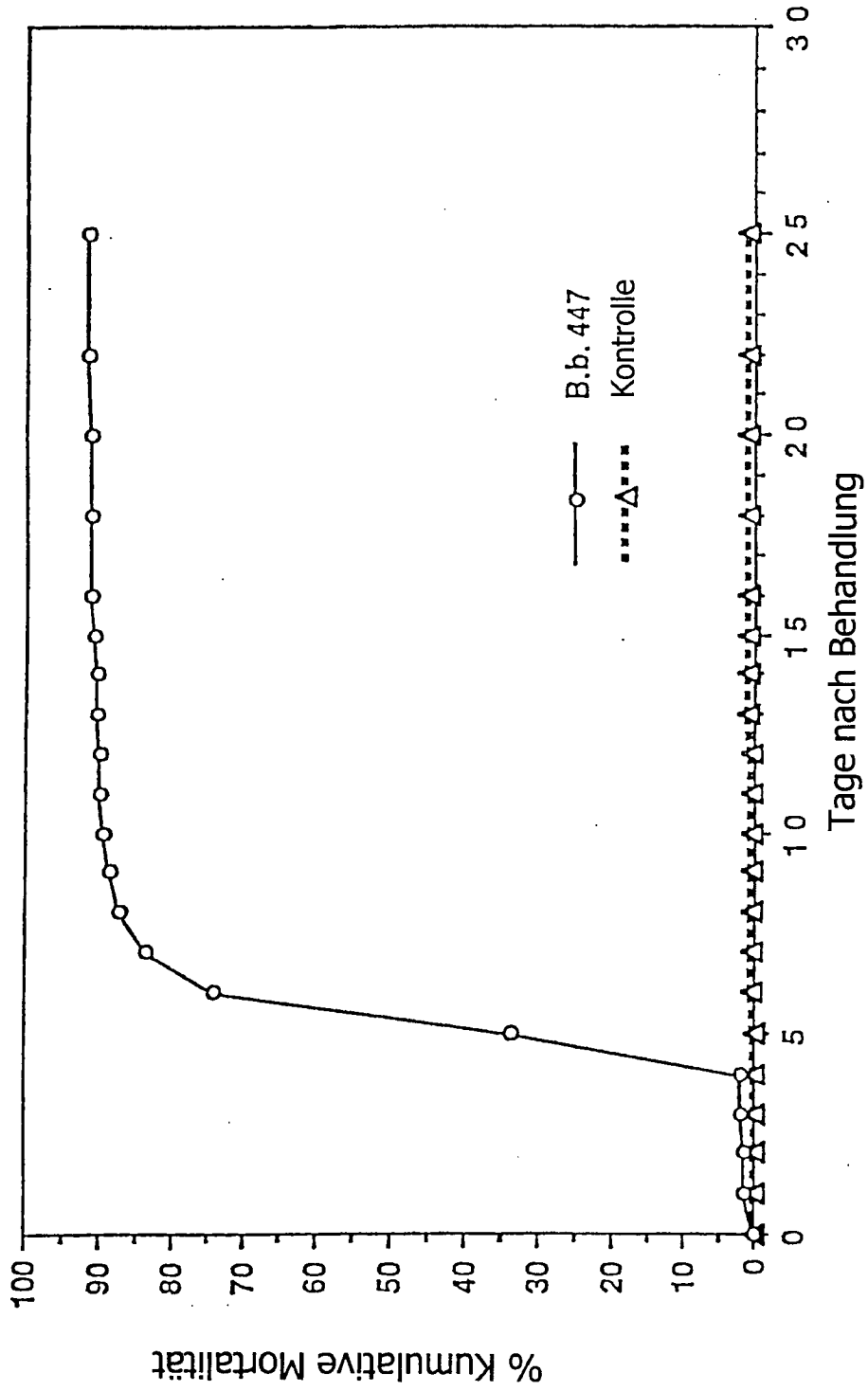


Fig. 2

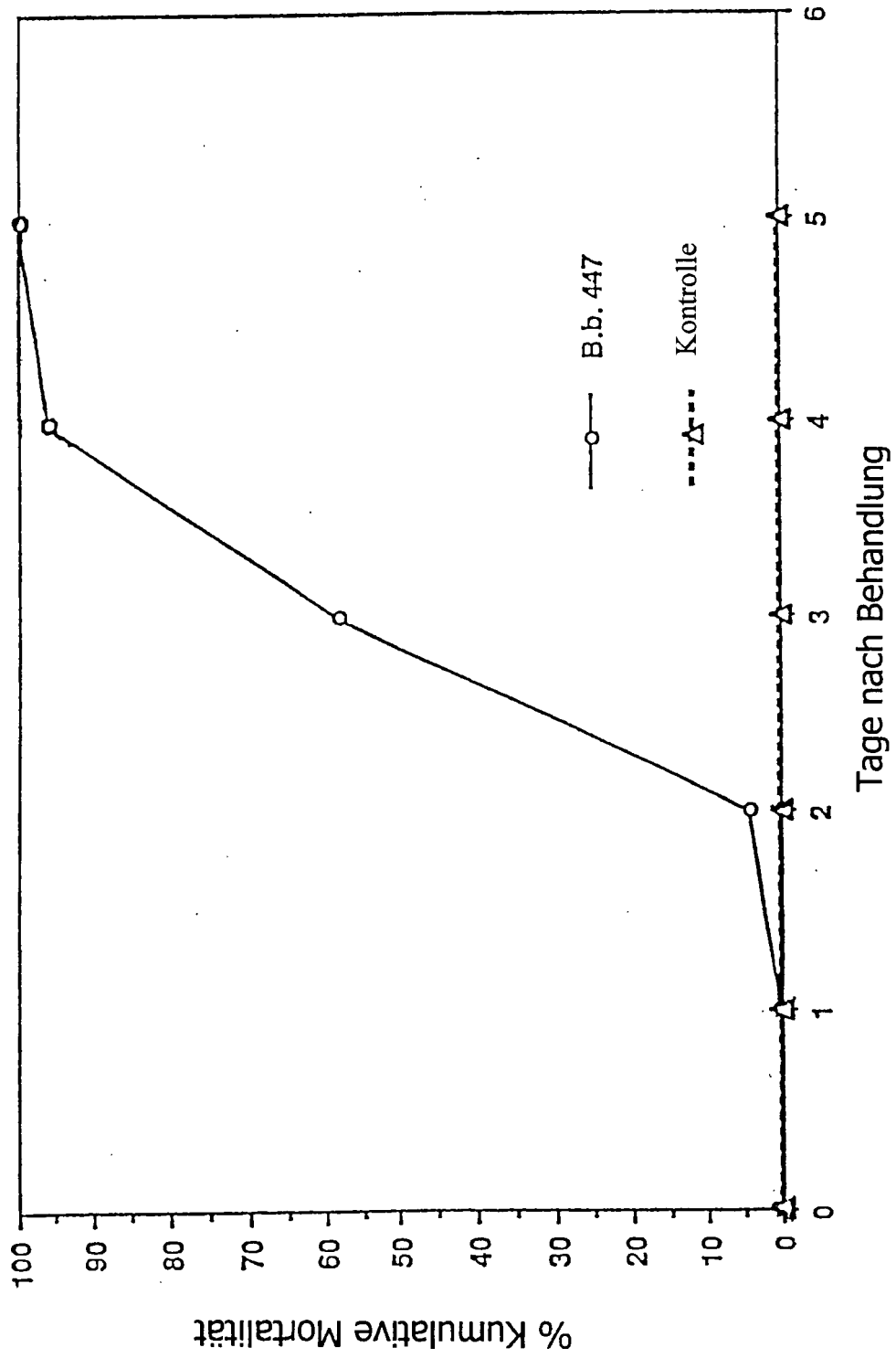


Fig. 3

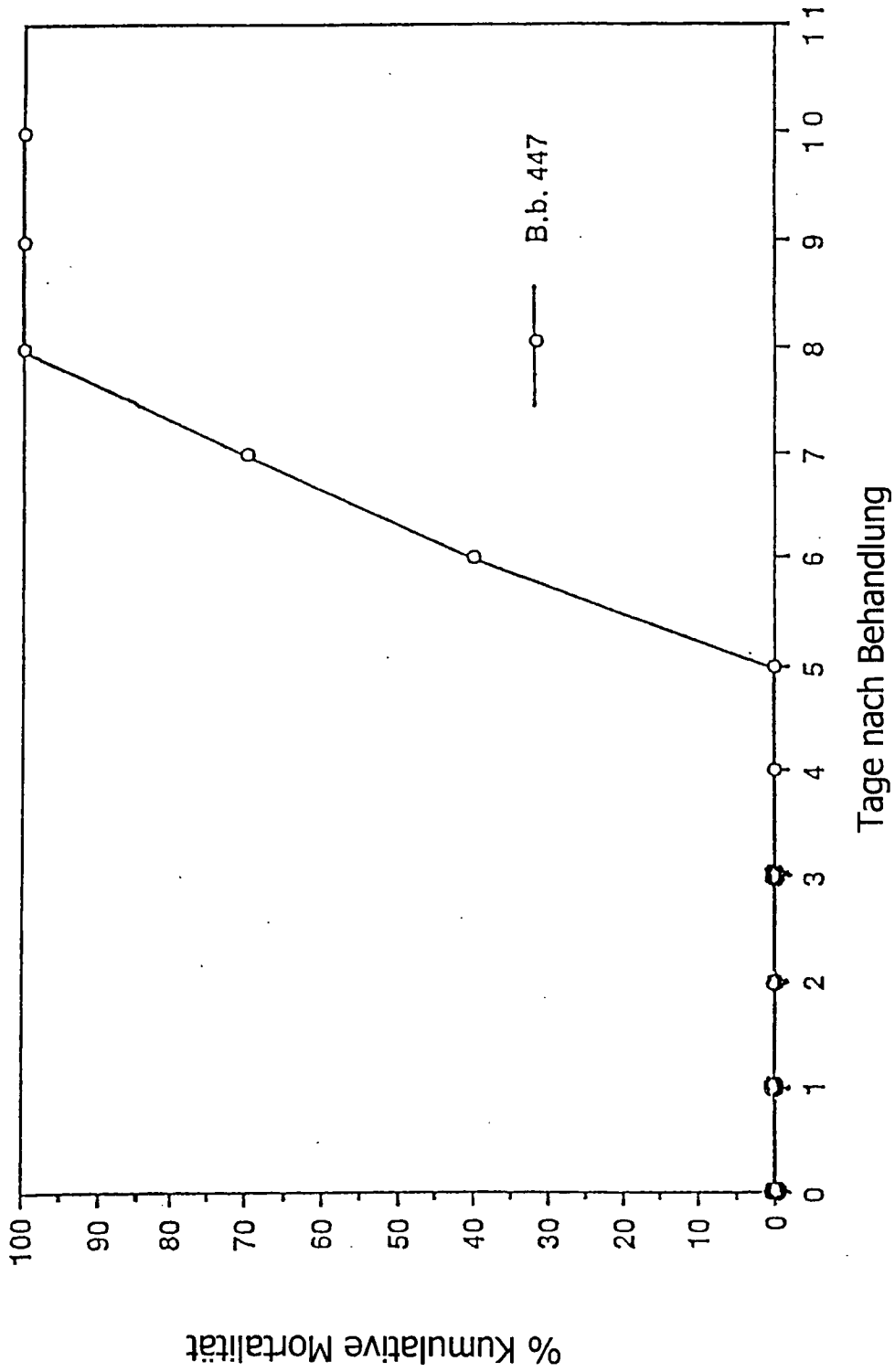


Fig. 4

Fig. 5

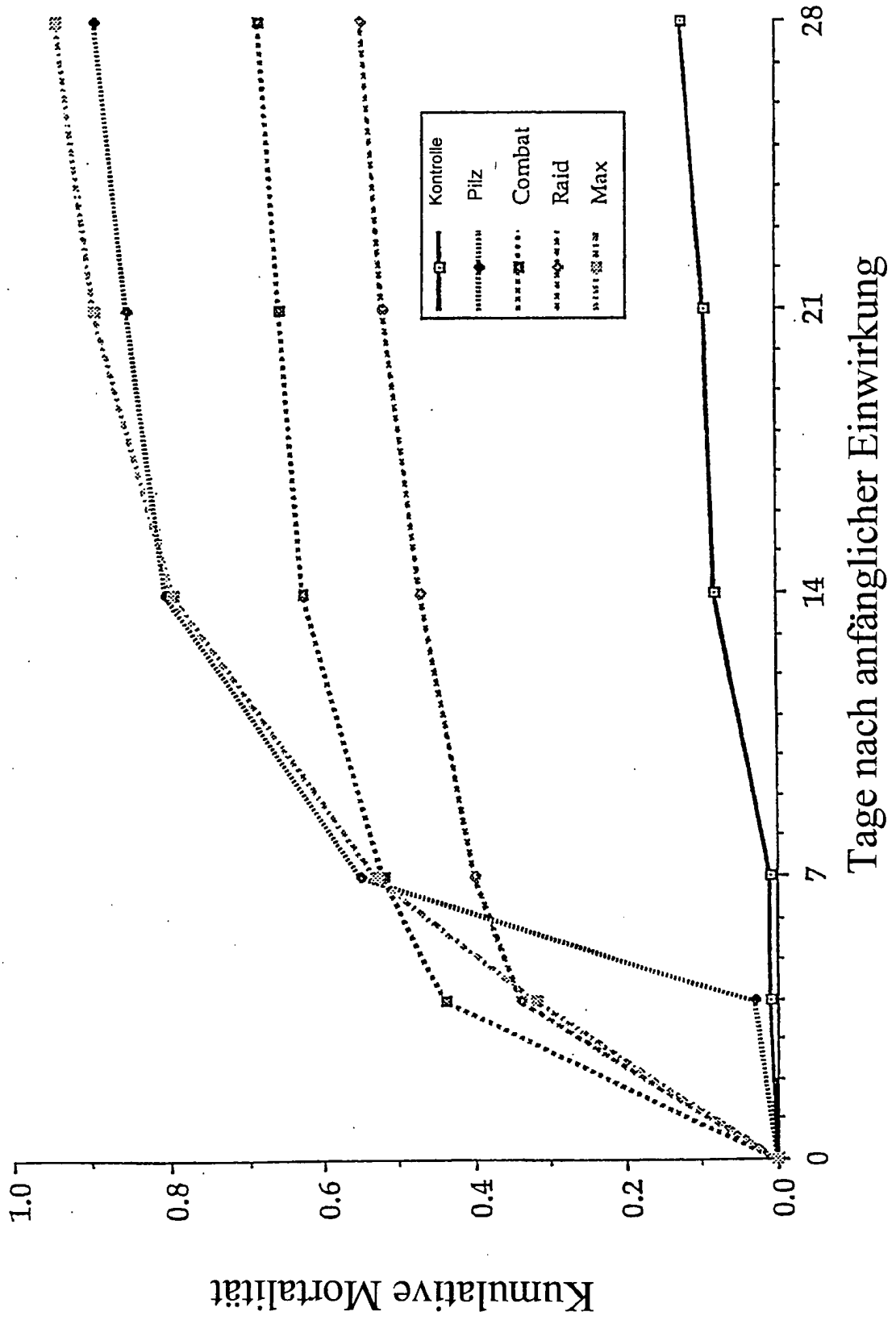


Fig. 6

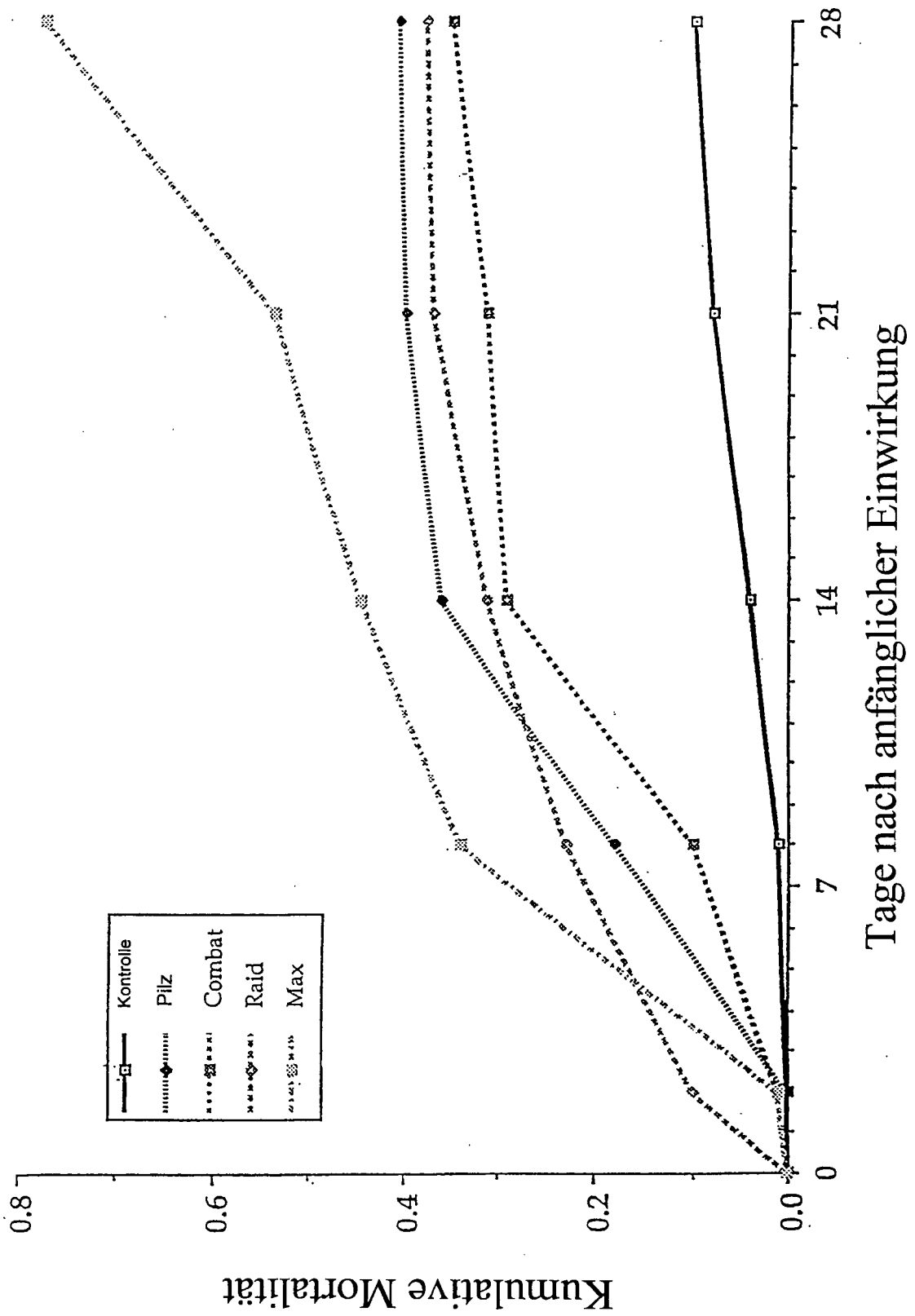




Fig. 7

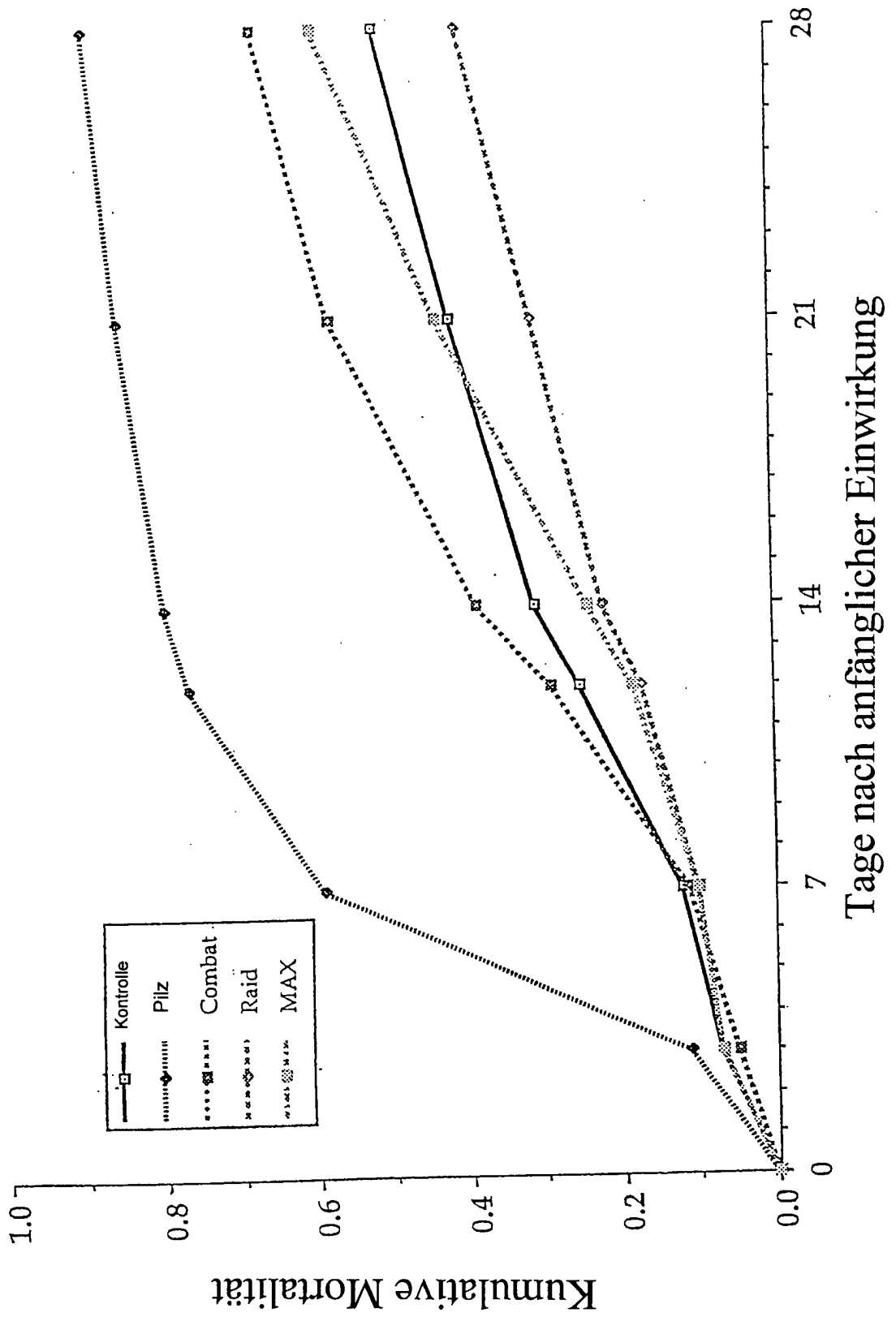


Fig. 8

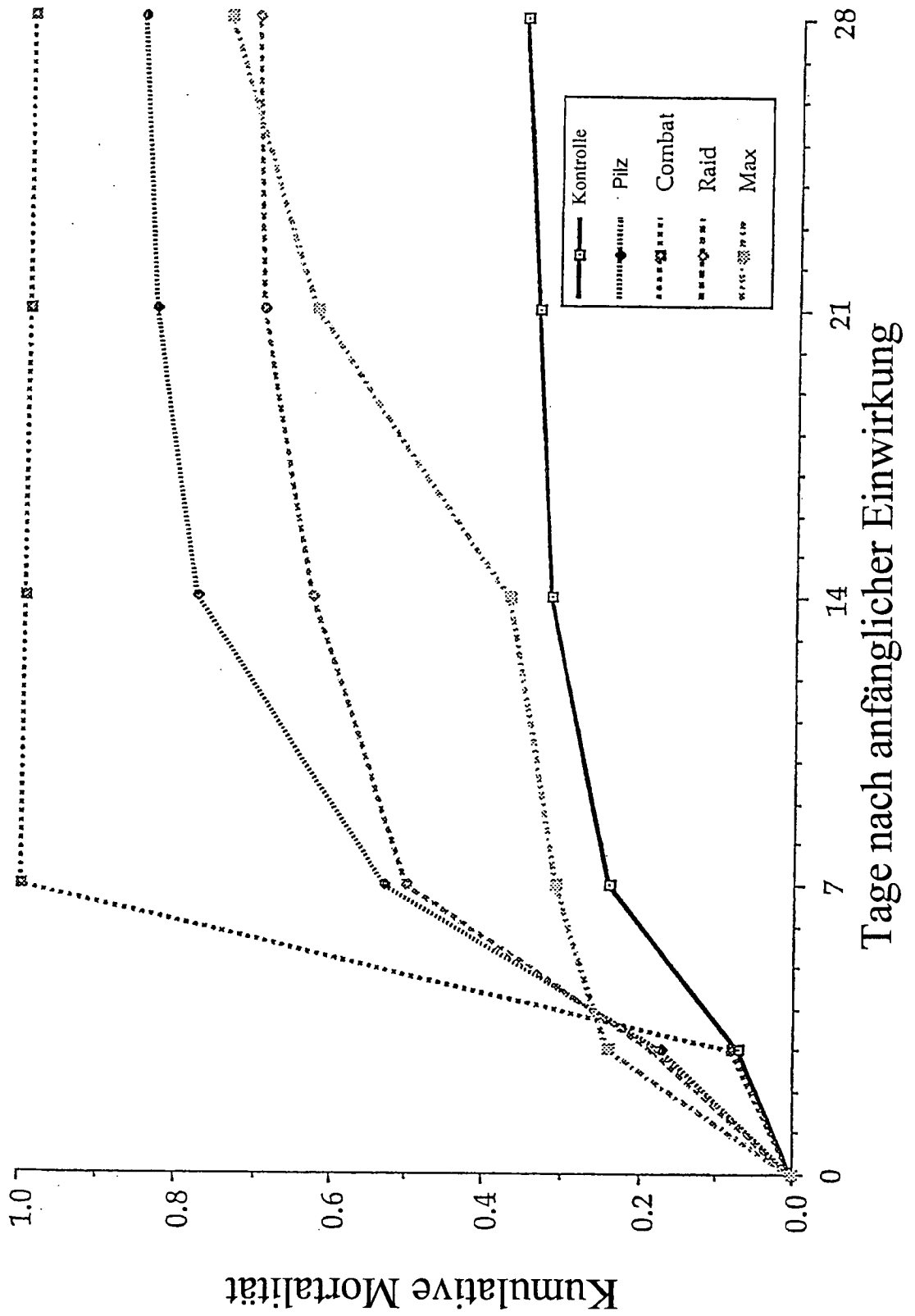


Fig. 9

