Biorational Approach for *Rhyzopertha dominica* Control in Storage System for *Triticum aestivum*

PRACHI SINGH

CENTRE FOR RURAL DEVELOPMENT AND TECHNOLOGY

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

OCTOBER 2018

Biorational Approach for *Rhyzopertha dominica* Control in Storage System for *Triticum aestivum*

by

PRACHI SINGH

Centre For Rural Development And Technology

Submitted

In fulfillment of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy

to the

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

OCTOBER 2018

CERTIFICATE

This is to certify that the thesis entitled, **"Biorational approach for *Rhyzopertha dominica* control in storage system for *Triticum aestivum*"** being submitted by **Ms. Prachi Singh** to the **Indian Institute of Technology Delhi** for the award of '**Doctor of Philosophy**' is a record of bonafide research work carried out by her. She has worked under our guidance and supervision, and has fulfilled the requirements for the submission of this thesis. To the best of our knowledge, the results contained in this thesis have not been submitted, in part or full, to any other university or institute for the award of any degree or diploma.

(Dr. S. N. Naik)
Professor
Centre for Rural Development and Technology
Indian Institute of Technology Delhi

(Dr. Santosh Satya)
Professor
Centre for Rural Development and Technology
Indian Institute of Technology Delhi

Acknowledgements

At the outset, I would like to thank whole heartedly my supervisors, Prof. Santosh Satya and Prof. S. N. Naik, Centre for Rural Development and Technology for paving the way towards successful completion of this research work. Their indepth knowledge and deep fervour for research has helped me a lot. My thesis is an outcome of their novel ideas, constructive suggestions and careful editing. It is my privilege to work under their able guidance.

I am also thankful to Prof. Satyawati Sharma (Former Head) and Prof. V.K. Vijay, Head, Centre for Rural Development and Technology for providing me with facilities and financial approval as and when required for my research work. I thank my SRC members – Prof. Rajendra Prasad, Prof. K.K. Pant and Prof. Anushree Malik for their valuable suggestions and comments during my progress presentations which have strengthened my research findings.

I would like to extend my heartfelt thanks to Director, Indian Grain Management Reseacrh Institute (IGMRI), Hapur (U.P.) for granting me permission to use their lab facilities. I am thankful to Mr. Sunil Sharma, Lab technician, IGMRI for the help during experimentation. I thank Dr. P. K. Patanjali and Dr Saurabh Dubey, Institute of Pesticide Formulation Technology (IPFT) for providing me training on development of bioformulations.

I am indebted to my Husband – Mr. Anil Malik for standing by my side and lending a sympathetic ear through all odds. Constant encouragement from my in laws' side is also appreciated. Being from an altogether different field of study, they boosted me to be determined to achieve my goals.

I profusely thank my parents and siblings - Ms. Chhaya Singh, Ms. Ritu Singh and Mr. Pratap Singh for their wise counsel and unconditional support. Chhaya didi, your perspective that the spirit of resilience reigns supreme, has pushed me through all ups and downs. You have always been there for me! Thanks a lot.

I am gratified to have such great friends from other departments who had never allowed pessimism to sink in. Special thanks to Dr. Swati Sidana, Dr. Mainisha, Dr. Rabia (Maths Deptt), Dr. Pankaj Parashar, Ms. Avinash Kaur (CBME), Ms. Namrata Pachori, Ms. Deachan, Mr. Aditya Gokhale and Dr. Sanjeet Kumar. Transcending the boundaries of cultural difference, I would like to extend my heartfelt gratitude to my friends- Dr. Linda from Nigeria, Dr. Jakob from Denmark and Dr. Martiros from Armenia who have amused me with their PhD tales and have boosted my morale to keep going.

Thanks a ton to Dr. S. Kumar, my senior who has pacified me in tough times. I gratefully acknowledge Ms. Vinod Kotwal for guiding me and keeping me in high spirits. Thanks for the numerous level discussions held at CCD along with chilled Caffe frappe and sumptuous pie. Ma'am, there is a lot to learn from you – a person with Type A Personality.

I also acknowledge and thank the cooperation extended by my labmates (Dr. Neeru Kadian, Mr. Ajay Kumar, Mr. Umesh Sharma, Mr. Mukesh Jain, Dr. Perminder Jit Kaur, Dr. Vikas Kardam, Ms. Arjoo, Ms. Monu), CRDT office staff and lab attendants (Mr. Gopi Mr. Satender and Mr. Lokender).

Last but definitely not the least, I am thankful to Almighty for showering His blessings and enabling me to complete the research work.

Prachi Singh

Abstract

Wheat (*T.aestivum*) is an important dietary component serving as a good source of carbohydrates, B vitamins and some minerals. In order to preserve the quality, viability of grains and maintain the food supply, they are stored either at domestic level or large scale centralized system. During storage, the wheat grains are susceptible to insect-pest attack especially coleopteran species. Out of these species, *Rhyzopertha dominica* is the most dangerous insect-pest, an internal feeder which can damage both sound and cracked kernel. Infestation depreciates the grain mass and its nutritional as well as aesthetic value rendering it unfit for human consumption.

In the prevailing agricultural scenario, chemical pesticides are being used to mitigate the post-harvest losses. Aluminium phosphide is a chemical fumigant being widely used at domestic level. However, the excessive use of these insect control agents has led to pest resistance and pesticide residue in food commodity. These synthetic pesticides have deep negative impact on human health. Researchers worldwide, are exploring safer alternatives to chemical pesticides. In this background, present study focuses on following main aspects i) Effect of *R. dominica* infestation on quality parameters of wheat under storage ii) Development of suitable bioformulation against *R. dominica* and its testing under laboratory as well as simulated field conditions. In addition to this, a preliminary investigation on spatio-temporal movement of *R. dominica* to comprehend its biological characteristics useful for designing storage bins has been carried out.

Effect of *R. dominica* infestation on quality parameters of wheat under storage was studied by following standard protocols. At 50% level of *R. dominica* infestation, carbohydrate, protein and gluten content of infested wheat was found to decrease by 19.77%, 8.06% and 54.8%, respectively. 3-D profilometry using optical microscopy and SEM analysis have been performed to indicate zone of depth and cracks/ cavities within damaged layer of wheat grains, respectively. Spatio-temporal movement studies revealed that *R. dominica* adults prefer to colonize in the upper mass of the glass unit.

Bioefficacy screening of five essential oils (*M. arvensis, A. graveolens, C. longa, C. citratus* and *C. sinensis*) for their pesticidal potential against *R. dominica* was carried out by employing different bioassays (contact toxicity, fumigation and repellency). GC–MS analysis of selected essential oils was also performed to understand the chemical composition. The results from our study reveal that out of selected essential oils, *M. arvensis* essential oil showed the highest insecticidal potential as contact toxicant and fumigant against *R. dominica* population resulting in more than 85 % mortality. However, its effectiveness persists only for a few days.

However, literature document that essential oils' effectiveness reduces over time owing to their volatilization and decomposition. Therefore, spontaneous emulsification method was employed to develop *M. arvensis* EO based oil-in-water (O/W) nanoemulsion. Physico-chemical characterization of the developed nanoemulsion was performed. Particle size analysis reveals an average droplet size of 11.98 nm with unimodal distribution and rheological studies indicate viscosity of 140 cP. SEM and TEM analysis showed discrete and spherical morphology of the droplets. *Mentha arvensis* essential oil based nanoemulsion resulted in 85% mortality of *R. dominica* adults at 2 mg/ml dose after 72 h of exposure. In order to further

enhance the insecticidal property of developed nanoemulsion, synergistic combinations of other essential oils (*A. graveolens* and *C. longa*) and incorporation of aqueous filtrates of *Karnaja* (*P. pinnata*) de-oiled cake and *Neem* (*A. indica*) de-oiled cake in the developed bioformulation were also tried. However, these attempts failed to further improve the mortality percentage of model pest.

Finally, inorder to achieve pronounced insecticidal property of developed nanoemulsion, 0.5% copperized *neem* oil was incorporated in 4.5% mentha oil and a novel integrated nanoemulsion was prepared. The integrated bioformulation resulted in ~ 92% mortality of *R. dominica* adults at 2 mg/ml dose after 72 h of exposure. SEM analysis revealed spherical morphology of nanoemulsion particles and ocular inspection showed that there was no colour change and phase separation. Thus, it was found to be stable. Small contact angle (32.93°) of formulation with galvanized steel surface proved its good wettability and surface adherence which are important aspects for field applications.

Shelf life studies depicted that menthol - the bioactive constituent of newly developed integrated nanoemulsion reduced by 4%, 17% and 31% at 10℃, 30℃ and 40℃, respectively over storage period of 02 months. Release kinetics study of the above emulsion from jute matrix was investigated under different temperature conditions. Retention of menthol (bioactive constituent) was found to be maximum at 10℃ (60%) followed by 30℃ (15%) and least at 40℃ (02%). The physico-chemical characterization of freshly prepared nanoemulsion and after 02 months of storage under different temperatures indicated the stability of the developed bioformulation. GC–MS analysis of nanoemulsion confirmed the entrapment of bio-active constituent – menthol in same concentration (65%) as present in pure essential oil.

The newly developed bioformulation exhibited ~ 92% mortality of *R. dominica* in contact toxicity bioassay. Further, in experiments under simulated field conditions, it proved to be successful in controlling the artificial infestation in wheat grains stored in small jute bags and in galvanized steel bins. The cytotoxic effect of developed formulations i.e. *M. arvensis* EO based nanoemulsion and integrated formulation was investigated using MTT assay on NIH3T3 fibroblast cell lines. The nanoformulation showed 73.7% and 50.7% cell viability at 3.0 mg/ml and 5.0 mg/ml concentration, respectively. The expected concentration to cause 95% insect mortality is slightly less than 3.0 mg/ml (2.77 mg/ml). Therefore, the integrated formulation at the selected dose applied in storage bins or bags are unlikely to cause any toxicity.

Overall, the results of the present study would provide a green alternative for domestic level grain storage system in rural sector. In fact these research findings form small steps in the journey of paradigm shift related to food safety.

सारांश

गेहूं (*T. aestivum*) एक महत्वपूर्ण आहार घटक है जो कार्बोहाइड्रेट, बी विटामिन और कुछ खनिजों का अच्छा स्रोत है। खाद्य आपूर्ति और गेहूं की गुणवत्ता को बनाए रखने के लिए, घरेलू स्तर या बड़े पैमाने (केंद्रीकृत प्रणाली) पर इसका भंडारण किया जाता हैं। सामान्य रूप से भंडारण के दौरान, गेहूं मे *Rhyzopertha dominica* (Coleopteran प्रजाति) का संक्रमण हो जाता है। यह एक आंतरिक फीडर है जो साबुत व टूटे हुये दाने को नुकसान पहुंचाता है। कीट संक्रमण अनाज के भार और इसके पोषक तत्वो को कम करता है जो इसे मानव उपयोग के लिए अनुपयुक्त बनाता है।

वर्तमान कृषि परिदृश्य में, सुरक्षित अनाज भंडारण हेतु रासायनिक कीटनाशकों का उपयोग किया जा रहा है। एल्यूमीनियम फॉस्फाइड घरेलू स्तर पर व्यापक रूप से उपयोग किया जा रहा है। इन कीट नियंत्रण पदार्थो के अत्यधिक उपयोग से खाद्य वस्तुओं में कीटनाशक अवशेष रह जाते हैं तथा कीट प्रतिरोध विकसित हो जाता है। इन रासायनिक कीटनाशकों का मानव स्वास्थ्य पर गहरा नकारात्मक प्रभाव पड़ता है। इसीलिए दुनिया भर में शोधकर्ता, रासायनिक कीटनाशकों के लिए सुरक्षित जैव विकल्प तलाश रहे हैं। इस पृष्ठभूमि में, वर्तमान अध्ययन निम्नलिखित मुख्य पहलुओं पर केंद्रित है i) भंडारण के दौरान गेहूं के गुणवत्ता मानकों पर *R. dominica* संक्रमण का प्रभाव ii) *R. dominica* के नियंत्रण के लिए उपयुक्त जैव निरूपण (Bio-formulation) विकसित करना और प्रयोगशाला स्तर के साथ अनुरूपित क्षेत्रीय परिस्थिति के तहत इसका परीक्षण। इसके अतिरिक्त, भंडारण हेतु टंकी डिजाइन के लिए उपयोगी, कीट की जैविक विशेषताओं को समझने के लिए *R. dominica* के स्थानिक-अस्थायी गति (spatio-temporal movement) पर प्रारंभिक अन्वेषण किया गया है। भंडारित गेहूं के गुणवत्ता मानकों पर *R. dominica* का प्रभाव स्थापित प्रोटोकॉल द्वारा अध्ययन किया गया। 50% संक्रमण स्तर पर *R. dominica* संक्रमित गेहूं का कार्बोहाइड्रेट, प्रोटीन और ग्लूटेन मे क्रमशः 19.77%, 8.06% और 54.8% की कमी आई है। 3-D profilometry ऑप्टिकल माइक्रोस्कोपी और SEM विश्लेषण का उपयोग गेहूं अनाज की क्षतिग्रस्त परत के भीतर गहराई और दरारो को इंगित करने के लिए किया गया है। स्थानिक-अस्थायी गति के अध्ययन से पता चला कि वयस्क *R. dominica* ग्लास इकाई के ऊपरी अनाज परत में एकत्रित होना पसंद करते हैं।

R. dominica के विरुद्ध कीटनाशक क्षमता के लिए पांच सुगन्धित तेलो (*M. arvensis*, *A. graveolens*, *C. longa*, *C. citratus* और *C. sinensis*) की जैव सुरक्षा परीक्षण विभिन्न bioassay (contact toxicity, fumigation और repellency) द्वारा किया गया हैं। रासायनिक संरचना को समझने के लिए चयनित सुगन्धित तेलो का GC-MS विश्लेषण भी किया गया हैं। हमारे अध्ययन के परिणाम बताते हैं कि चयनित सुगन्धित तेलो में से *M. arvensis* तेल उच्चतम दक्षता वाला कीटनाशक है। इसके द्वारा प्रयोगशाला परीक्षण में *R. dominica* का 85% मृत्युदर प्राप्त हुआ। लेकिन इसकी प्रभावशीलता केवल कुछ दिनों तक ही कायम रहती है, ऐसा साहित्य मे भी वर्णित है। इसलिए, *M. arvensis* तेल आधारित आयिल-इन-वॉटर (o/w) नैनोइमल्सन स्वचालित इमल्सीफिकेशन विधि द्वारा बनाया गया। विकसित नैनोइमल्सन का भौतिक-रासायनिक विश्लेषण किया गया। इसका कण आकार 11.98 nm पाया गया तथा इसके प्रवाही गुण अध्ययन में इसकी श्यानता 140 cP पायी गयी। SEM और TEM विश्लेषण ने बूंदों का गोलीय आकार दर्शाया।

2 mg/ml सांद्रता वाले *M. arvensis* तेल आधारित नैनोइमल्सन से 72 घंटो के बाद *R. dominica* वयस्कों की 85% मृत्यु दर प्राप्त हुई। इस नैनोइमल्सन की कीटनाशक क्षमता को आगे बढ़ाने के लिए अन्य सुगन्धित तेलो ((*A. graveolens* और *C. longa*) और करंज (*P. pinnata*) व नीम (*A. indica*) खल के जलीय खनक को विकसित नैनोइमल्सन मे मिलाया गया। हालांकि, ये प्रयास कीट के मृत्यु दर वृद्धि में असफल रहे।

अंततः विकसित नैनोइमल्सन की वर्धित कीटनाशक क्षमता प्राप्त करने के लिए, 0.5% कॉपरआइज़्ड नीम का तेल 4.5% मेन्था तेल में मिलाया गया और एक नवीन एकीकृत नैनोइमल्सन तैयार किया गया। 2 mg/ml सांद्रता वाले एकीकृत बायोफॉर्म्यूलेशन ने 72 घंटो के बाद *R. dominica* वयस्कों की ~ 92% मृत्यु दर प्राप्त की। SEM विश्लेषण ने बूंदों का गोलीय आकार दर्शाया। इस बायोफॉर्म्यूलेशन का नियमित निरीक्षण किया गया, इसमें कोई रंग परिवर्तन या चरण पृथक्करण नहीं पाया गया। गैल्वनाइज्ड स्टील सतह के साथ फॉर्मूलेशन के छोटे संपर्क कोण (32.93 °) इसकी उत्तम फैलाव और सतह पर चिपकना प्रमाणित करते हैं जो बड़े स्तर पर इसके अनुप्रयोगों के लिए महत्वपूर्ण पहलू हैं।

भण्डारण सेवा अवधि अध्ययन ने दर्शाया कि दो महीने की अवधि के बाद 10 °C, 30 °C और 40 °C पर बायोफॉर्म्यूलेशन की मेन्थॉल मात्रा 4%, 17% और 31% कम हो गयी। इस बायोफॉर्म्यूलेशन का समय बद्ध प्रभावशीलता गतिज (release kinetics) अध्ययन विभिन्न तापमान पर जूट मैट्रिक्स मे किया गया। 10 °C, 30 °C और 40 °C पर 60%, 15% और 02% मेन्थॉल (बायोएक्टिव घटक) जूट मैट्रिक्स मे शेष पाया गया। ताजा तैयार नैनोइमल्सन के भौतिक-रासायनिक विश्लेषण और विभिन्न तापमान पर 02 महीने के भंडारण के बाद इस बायोफॉर्म्यूलेशन की स्थिरता का प्रमाण मिलता है। शुद्ध सुगन्धित तेल और नैनोइमल्सन के GC-MS विश्लेषण ने मेन्थॉल की समान मात्रा (65%) की पुष्टि की।

नवीन एकीकृत नैनोइमल्सन से संपर्क विषाक्तता bioassay मे *R. dominica* का ~ 92% मृत्यु दर प्राप्त हुआ। अनुरूपित क्षेत्र की स्थितियों (छोटे स्केल) के आधारित प्रयोगों में भी इस बायोफॉर्म्यूलेशन ने उच्चतम कीट नियंत्रण दर्शाया। बायोफॉर्म्यूलेशन का कोशिका विषाक्तता प्रभाव MTT assay द्वारा NIH3T3 फाइब्रोब्लास्ट कोशिका पर किया गया। नैनोफॉर्म्यूलेशन ने क्रमश: 3.0 mg/ml और 5.0 mg/ml सांद्रता पर 73.7% और 50.7% कोशिका viability दिखायी। 95% कीट मृत्यु दर के लिए चयनित सांद्रता (2.77 mg/ml) अपेक्षित सांद्रता (3.0 mg/ml) से कम है। अतः चयनित सांद्रता का भंडारण टंकी या बैग में प्रयोग से किसी भी प्रकार की विषाक्तता होने की संभावना नहीं है।

कुल मिलाकर, वर्तमान शोध कार्य ग्रामीण क्षेत्र में घरेलू स्तर पर अनाज भंडारण के लिए जैव विकल्प प्रदान करता हैं। वास्तव मे ये शोध परिणाम खाद्य सुरक्षा से संबंधित ‘चिंतन मनन परिवर्तन’ की यात्रा मे एक छोटा सा कदम हैं।

Contents

List of Figures

List of Tables