

## TOXICITE ET PERSISTANCE EN MILIEU MARIN D'UN INSECTICIDE DERIVE DES BENZOYLUREES : LE DIFLUBENZURON

par Claude ALZIEU

avec la collaboration technique de J. SANJUAN

### *Summary*

The laboratory tests showed that the diflubenzuron does not present acute toxicity to shellfish and fish, but can affect the survival rate of *Artemia salina* and shrimp *Palaemonetes varians*, when its concentration arises to the level of its water solubility. The insecticide persistence in sea water had been found to be 3 weeks and its concentration factor in the fish after 52 days of exposure was very low (0,2).

The use of dimilin in coastal zones for eradication of processionary caterpillar seems to have an insignificant impact on marine ecosystem, particularly on the molluscs.

La protection du domaine forestier contre certains insectes ravageurs comme les chenilles processionnaires du pin est assurée depuis de nombreuses années par les traitements phytosanitaires pratiqués en automne. Les pesticides chimiques, DDT, malathion, ont rapidement été abandonnés au profit d'un insecticide biologique à base de *Bacillus thuringiensis* qui a l'avantage d'être spécifique des chenilles processionnaires. Son emploi en zone littorale ne présente aucun danger pour les élevages conchylicoles et la faune marine (ALZIEU et coll., 1975).

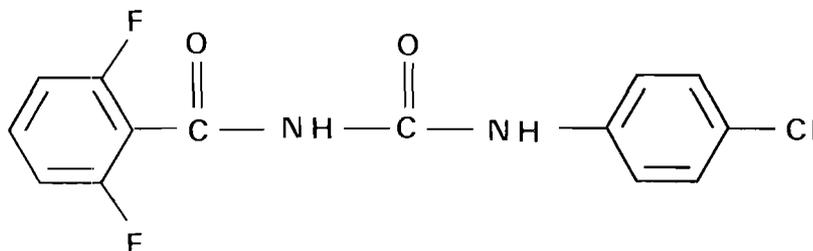


FIG. 1. — Formule développée du diflubenzuron.

Néanmoins, la recherche phytosanitaire se poursuit. Ainsi a été mise en évidence l'activité larvicide du 1 - (4 - chlorophenyl) - 3 - (2,6 - difluorobenzoyl) urée, communément appelé diflubenzuron (fig. 1).

Le diflubenzuron est une substance cristalline blanche peu soluble dans l'eau (0,2 mg/l), mais soluble dans les solvants organiques très polaires : 104 g/l dans la diméthylformamide et 24 g/l dans le dioxane à 25° C. Les solutions aqueuses sont stables en milieu acide ou faiblement basique (pH ≤ 9).

POST et coll. (1973) ont montré que le diflubenzuron inhibe la formation de la chitine dans l'endocuticule des larves de différents insectes : chenilles défoliatrices, moustiques, mouches... La

cuticule formée chez les individus traités n'est pas suffisamment résistante pour s'opposer aux tensions musculaires de la mue, et sa rupture prématurée entraîne la mort des larves.

Une formulation en poudre mouillable à base de 25 % de diflubenzuron, le dimilin, est autorisée à la vente en France. Il nous a paru intéressant d'étudier la persistance en milieu marin du diflubenzuron et sa toxicité, afin d'évaluer les risques de contamination indirecte des élevages conchylicoles en cas d'emploi en zone littorale pour protéger les forêts ou détruire les larves de moustiques.

## 1. Expérimentations et résultats.

### 1° *Persistance en milieu marin.*

Les effets des résidus des traitements insecticides sur la vie de la faune associée sont d'autant plus importants que le biocide utilisé présente une rémanence élevée dans le milieu. Des composés tels que le DDT résistent pendant des années aux processus physicochimiques (hydrolyse) ou biochimiques de dégradation qui interviennent normalement en milieu naturel, notamment dans les eaux saumâtres.

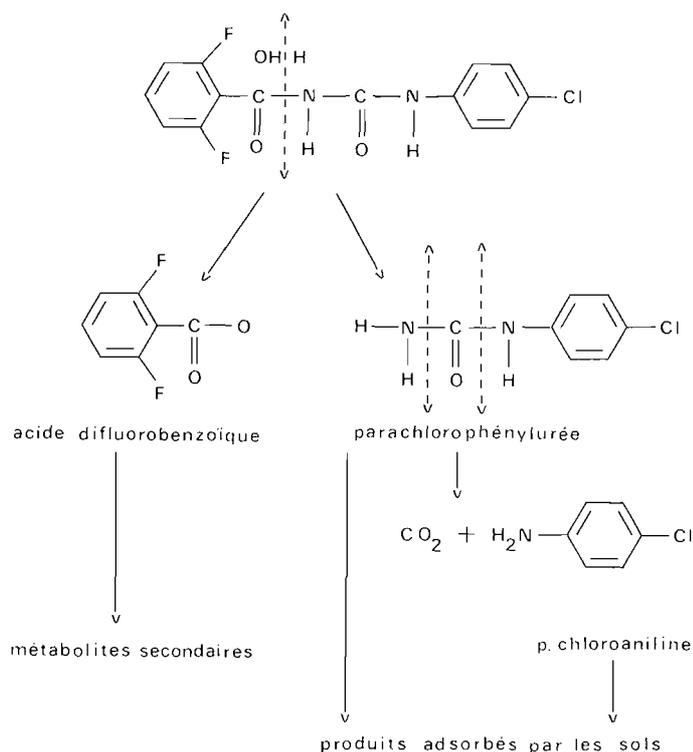


FIG. 2. - Mécanismes de dégradation du diflubenzuron.

La persistance du diflubenzuron a été très peu étudiée en milieu aqueux : SCHAEFER et DUPRAS (1976) ont montré que la stabilité du dimilin diminuait quand le pH était supérieur à 7,7, or le pH dans les eaux saumâtres est d'ordinaire supérieur à 8,0. La question a été mieux étudiée dans les sols agricoles où les nombreux travaux résumés par VERLOOP et FERREL (1977) montrent que la présence des microorganismes dans les sols est un facteur prépondérant de leur capacité à dégrader les benzoylphénylurées. A titre d'exemple, la dégradation du diflubenzuron, qui atteint 98 % en 4 semaines dans une terre sablonneuse, tombe à 6 % dans le même temps si la terre est stérilisée.

Les études faites à l'aide de molécules marquées (VERLOOP et FERRELL, 1977) ont montré que le processus de biodégradation débutait par une hydrolyse de la liaison C-N donnant de l'acide difluorobenzoïque et de la parachlorophényl urée. L'acide 2,6 difluorobenzoïque est rapidement métabolisé. La parachlorophényl urée est en grande partie transformée en produits adsorbés ou fixés par les sols. La parachloroaniline peut constituer un produit intermédiaire de dégradation, mais elle n'a pas été trouvée sous forme libre dans les sols (fig. 2).

Pour estimer la rémanence du diflubenzuron, nous avons étudié sa résistance à l'hydrolyse en milieu aseptique et sa dégradation en présence de microorganismes d'origine marine.

### Méthodes.

La méthode utilisée pour évaluer la persistance du diflubenzuron a été adaptée de celle mise au point par DE KREUK (1976) et communément appelée "Die Away Test". Ce test, qui ne tient pas compte des phénomènes d'absorption et de dégradation qui peuvent avoir lieu au niveau des matières en suspension et des sédiments, vise uniquement à connaître la stabilité de la fraction solubilisée dans la phase aqueuse.

Dans un erlenmeyer de 1 l à col rodé muni d'un bouchon en verre portant une tubulure latérale fermée par un septum en caoutchouc de silicone, sont successivement introduits :

290 ml d'eau de mer prélevée en milieu océanique, en un lieu supposé exempt de pollution, et filtrée à  $0,22 \mu$  ;

10 ml d'un inoculum bactérien provenant d'un culot de centrifugation de 1,5 l d'eau de mer fraîchement prélevée ( $S_{400} = 15,04$  ; turbidité = 34 N.T.U.) remis en suspension dans 50 ml d'eau de mer filtrée à  $0,22 \mu$  ;

0,3 ml d'une solution acétonique contenant 0,5 mg/ml de diflubenzuron. Après homogénéisation, la concentration théorique dans le volume expérimental était donc voisine de 0,5 mg/l.

Dans les essais-témoins, l'inoculum a été remplacé par 10 ml d'eau de mer filtrée. Tous les erlenmeyers ont été placés à l'abri de la lumière dans une enceinte thermorégulée à  $16 \pm 0,1^\circ \text{C}$ .

Les teneurs en insecticide dans les essais ont été déterminées toutes les semaines sur un prélèvement de 5 ml obtenu à l'aide d'une seringue en verre dont l'aiguille était piquée à travers le septum. Le diflubenzuron extrait du prélèvement par 4 fois 10 ml d'acétate d'éthyle de qualité "Pestipur" était transformé en dérivé trifluoroacétylé selon la méthode de WOROBAY et WEBSTER (1976) puis dosé en chromatographie en phase gazeuse. Le chromatographe utilisé était équipé d'un détecteur à capture d'électron et d'une colonne en verre remplie de Chromport XXX 80-90 mesh imprégné de OV 210 à 5 %. Les températures de la colonne et du détecteur étaient respectivement de 180 et 250° C.

### Résultats.

Les résultats montrent que 90 % du diflubenzuron est détruit au bout de la troisième semaine d'essai. L'activité des microorganismes semble intervenir dans la destruction de l'insecticide au cours des 2 premières semaines (fig. 3) pendant lesquelles le taux de dégradation est plus élevé que celui obtenu en milieu aseptique. La dégradation physicochimique se développe de façon exponentielle à partir de la première semaine pour atteindre rapidement une valeur très élevée.

Le pH de l'eau de mer qui est généralement compris entre 8 et 8,5, donc légèrement basique, peut favoriser l'hydrolyse microbiologique et physicochimique du diflubenzuron. Cependant, dans les conditions de nos essais en eau de mer, la cinétique des mécanismes de dégradation est très lente. Elle semble être du même ordre de grandeur que celle observée dans les sols, puisque la demie-vie du diflubenzuron en eau saumâtre déterminée à partir des courbes de la figure 3 est comprise entre 1,5 et 2 semaines.

La résistance à l'hydrolyse des difluorophénylbenzoylurées augmente avantageusement la période d'efficacité insecticide lors des traitements des massifs forestiers, mais elle peut aussi constituer un inconvénient lorsque l'on envisage des applications en zones littorales humides comme c'est le cas pour les opérations de démoustication.

## 2° Toxicité aiguë.

Nous avons testé la toxicité à court terme du diflubenzuron à l'égard de différents animaux :

2 mollusques bivalves : *Mytilus edulis* (moule), *Crassostrea gigas* (huître) ;

3 crustacés : *Artemia salina* (artémie), *Palaemonetes varians* (crevette des marais), *Crangon crangon* (crevette grise) ;

2 poissons : *Gasterosteus aculeatus* (épineche), *Anguilla anguilla*, postlarve (civelle).

Les animaux d'expérimentation provenaient d'élevages conchylicoles (moules, huîtres), d'élevage en laboratoire (artémie), ou de pêches locales (crevettes, épinoches, civelles). Dès réception, ils ont été acclimatés pendant 48 h à la température de 16° C puis séparés en lots homogènes de 10 individus.

La résistance des différents organismes au diflubenzuron a été testée par immersion de chaque lot pendant 96 h dans des solutions de concentration de 0 — 0,001 — 0,01 — 0,05 — 0,1 et 0,2 mg/l, obtenues par addition à 2 l d'eau de mer naturelle (S‰ : 35) du volume approprié d'une solution acétonique contenant 0,2 g/l de diflubenzuron technique titrant 98,5 % de pureté. Dans ces conditions, nous avons obtenu la solubilisation totale du diflubenzuron introduit dans l'eau de mer.

### Mollusques.

Aucune mortalité n'a été observée dans les conditions de nos expériences, même aux concentrations les plus élevées. Les tests répétés plusieurs fois avec des lots différents et à des périodes de l'année différentes ont confirmé que la sécrétion du byssus des moules et leur fixation sur les parois des aquariums n'était pas affectée par la présence de l'insecticide.

L'activité des mollusques ne semble donc pas, à court terme, contrariée par la présence de diflubenzuron en solution.

### Crustacés.

Des mortalités significatives par rapport aux témoins ont été constatées au cours de plusieurs essais chez *Artemia salina* et *Palaemonetes varians* sans que l'on puisse établir de relation directe entre les taux de mortalité, qui n'ont jamais excédé 40 %, et la concentration. Aucune mortalité n'a été observée au cours des tests pratiqués avec les crevettes grises. Les artémies semblent plus sensibles que les crevettes des marais : après 96 h d'immersion à 0,2 mg/l, les taux de mortalités variaient respectivement de 10 à 40 % et de 0 à 20 %.

L'influence néfaste du dimilin sur la reproduction des artémies a été démontrée par CUNNINGHAM (1976) : la survie des *nauplii* est inférieure à 3 jours en présence de plus de 10 µg/l de dimilin et le taux d'éclosion des cystes produits par des individus immergés en présence de 2 µg/l ou plus d'insecticide est très nettement inférieur à celui des témoins.

### Poissons.

Aucune mortalité n'a été enregistrée au cours des tests sur les 2 espèces de poissons que nous avons expérimentées. Ces observations sont en accord avec les résultats publiés sur les poissons d'eau douce, qui donnent pour doses létales 50 % des valeurs supérieures à la limite de solubilité du dimilin dans l'eau (1).

## 3° Toxicité chronique.

Nous avons testé la résistance à long terme des épinoches exposées à des concentrations de 0,05 et 0,1 mg de diflubenzuron par litre d'eau de mer et à la température de 16° C.

(1) Document technique n° 260276. La Quinoléine, Paris.

A chacune de ces concentrations, 75 individus d'un poids moyen de 190 mg ont été répartis dans trois aquariums en verre contenant 20 l d'eau de mer additionnée de diflubenzuron. Le milieu expérimental a été renouvelé toutes les semaines pour tenir compte des phénomènes d'hydrolyse qui abaissent notablement la concentration en insecticide au cours de la deuxième semaine (fig. 3). Tous les individus ont été nourris quotidiennement au moyen de *nauplii* d'artémies élevées en milieu non contaminé.

Les courbes représentant les taux de mortalité en fonction du temps d'immersion (fig. 4) montrent que les premières mortalités ont été enregistrées au cours de la quatrième semaine, soit exactement le 25<sup>e</sup> jour à la concentration de 0,1 mg et le 27<sup>e</sup> jour à celle de 0,05 mg/l.

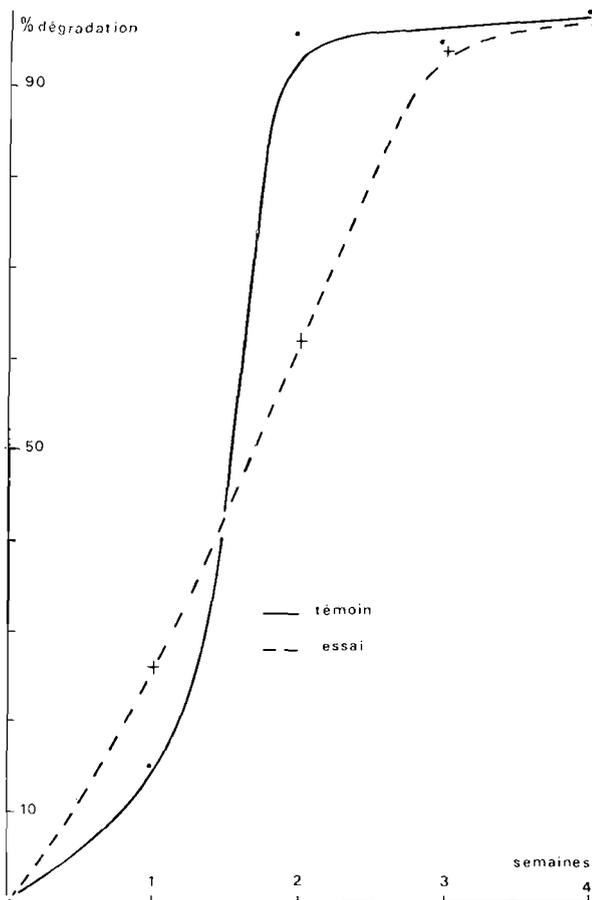


FIG. 3. — Pourcentage de dégradation du diflubenzuron en fonction du temps.

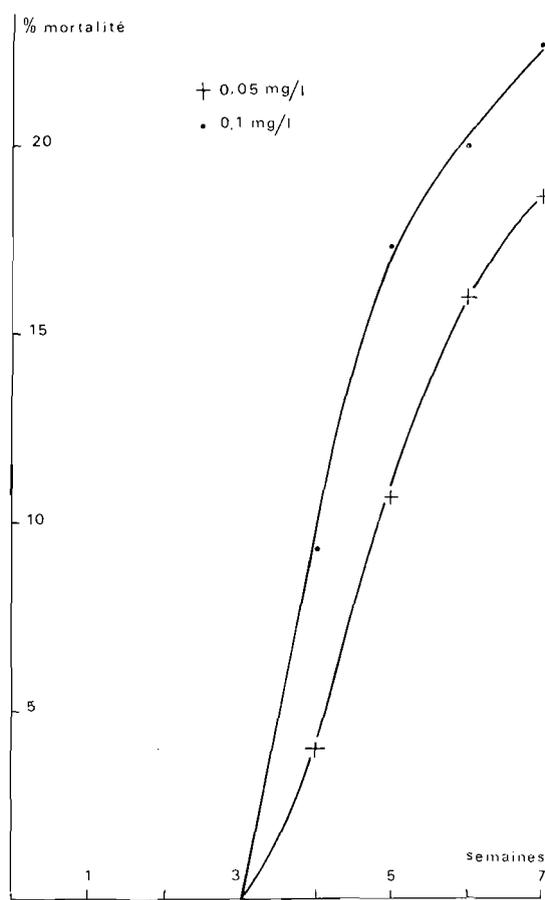


FIG. 4. — Taux de mortalité des épinoches en fonction de la durée d'exposition.

Les taux de mortalité cumulée augmentent régulièrement jusqu'à la fin de l'expérimentation, où ils sont en valeur moyenne peu différents l'un de l'autre : soit de la concentration la plus faible à la plus élevée, 18,7 et 22,7 %. Comparativement, aucune mortalité n'a été enregistrée dans les lots-témoins.

Ces résultats montrent que, à long terme, des traitements répétés maintenant de fortes concentrations de diflubenzuron dans l'eau, peuvent mettre en péril la survie des épinoches.

#### 4° Bioaccumulation.

A priori, le diflubenzuron qui ne persiste pas dans le milieu marin au-delà de quelques semaines et, de surcroît, est très peu soluble dans les lipides, a peu de chances de s'accumuler

de façon notable dans les organismes vivants. Néanmoins, il nous a paru nécessaire de vérifier cette hypothèse, en déterminant en laboratoire l'importance des quantités de résidus bioaccumulés par des poissons au cours d'une exposition prolongée au diflubenzuron.

Nous avons mesuré la concentration en insecticide dans les poissons soumis à l'expérience toxicologique à long terme. Pour ce faire, tous les 15 jours, nous avons prélevé 5 individus dans chaque aquarium. Des échantillons moyens ont été préparés en rassemblant les 15 individus exposés à la même concentration, soit 0,05 ou 0,1 mg/l. Chaque échantillon moyen a été déshydraté par lyophilisation. Le lyophilisat a été broyé avec du sulfate de soude anhydre pour favoriser l'extraction du diflubenzuron par de l'acétate d'éthyle "Pestipur" dans un appareil de type soxhlet. L'extrait évaporé à sec sous jet d'azote et repris par 10 ml de dichlorométhane "Pestipur" puis purifié sur une colonne 5 g de gel de silice (0,063 — 2 mm) (MILLER et coll., 1975; MAINI et DESEÖ, 1976) en éluant par 100 ml de dichlorométhane. L'éluat évaporé à sec sous jet d'azote est repris par 0,2 ml d'acétate d'éthyle. Le diflubenzuron est alors transformé en son dérivé trifluoroacétylé suivant la technique de WOROBÉY et WEBSTER (1977) et dosé en chromatographie en phase gazeuse dans les conditions indiquées ci-dessus.

mg/l dans l'eau	0,05		0,1	
	a	b	a	b
Exposition (jours)				
15	0,23	8,2	1,13	45,2
30	1,60	70,6	—	—
37	7,36	314,0	1,42	62,0
52	9,45	369,0	5,19	250,0

TABLE 1. — Accumulation directe du diflubenzuron par les épinoches : teneurs en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  par rapport à la chair humide (a) et au tissu lyophilisé (b).

Nos résultats montrent (tabl. 1) que les tissus des épinoches se chargent peu à peu de diflubenzuron. La teneur en résidu augmente rapidement au début de l'expérimentation et semble se stabiliser par la suite au moins chez les animaux exposés à la plus faible concentration de diflubenzuron.

Dans ces conditions, le facteur d'accumulation qui représente le rapport entre les teneurs accumulées et la concentration en diflubenzuron dans l'eau est seulement de 0,2. Les risques d'accumulation directe dans le milieu naturel de résidus de traitement au dimilin sont très limités.

Ces résultats sont en accord avec ceux de METCALF et coll. (1975) qui ont montré que la bioaccumulation du diflubenzuron dans un écosystème modèle est importante dans les larves de moustiques, mais beaucoup plus faible chez le poisson *Gambusia affinis*. Ces auteurs en concluent qu'il est exclu que le diflubenzuron s'accumule dans les poissons au travers des chaînes alimentaires de la même façon que le DDT ou le DDE.

## 2. Conclusions.

L'ensemble de nos résultats montre que le diflubenzuron :

- ne persiste pas plus de 4 semaines en milieu saumâtre ;
- peut avoir des effets néfastes à court terme sur certains crustacés et à long terme sur l'épinoche quand la concentration dans l'eau est voisine de la saturation ;
- ne s'accumule pas de façon notable dans les poissons.

Les tests que nous avons pratiqués visaient essentiellement à mettre en évidence les effets délétères de l'insecticide sur la faune marine. Les concentrations que nous avons utilisées pour ce faire sont par conséquent nettement plus élevées que celles qui se trouveraient dans le milieu naturel après épandage de dimilin. En comparant les écarts entre concentrations expérimentales et teneurs résiduelles dans le milieu, il est possible d'estimer l'impact sur la faune marine de l'emploi du dimilin en zone littorale.

On distinguera deux conditions d'utilisation suivant que l'insecticide est introduit directement en milieu aqueux dans le cadre des opérations de démoustication, ou entraîné secondairement vers des zones humides à partir des traitements forestiers.

#### *Démoustications.*

A notre connaissance, le dimilin n'est pas actuellement employé pour la lutte contre les moustiques sur le littoral français, mais selon les informations fournies par le fabricant<sup>(1)</sup> il serait efficace à l'égard de tous les stades larvaires à des concentrations de l'ordre de 5 µg/l. Les doses d'application recommandées varient entre 25 et 100 g de matière active à l'hectare suivant le degré de pollution de l'eau ; les concentrations théoriques dans l'eau d'un marais traité sont de l'ordre de 5 à 50 µg/l (profondeur d'eau comprise entre 0,20 et 0,50 m).

D'après nos résultats, ces concentrations sont à court terme sans danger pour les mollusques et les poissons, mais à la limite des doses tolérées par certains crustacés. Etant donné la persistance relativement longue du diflubenzuron en eau saumâtre, on peut raisonnablement craindre que les traitements démoustiquants n'entraînent des mortalités notables de crustacés et en particulier de crevettes. On remarquera cependant que l'épandage d'insecticide se fait obligatoirement dans des marais fermés, sans communication directe avec la mer, où la faune est régulièrement détruite par assèchement naturel.

L'abate, qui est actuellement l'insecticide le plus largement utilisé pour la démoustication, présente l'avantage d'être peu persistant en milieu saumâtre : sa  $\frac{1}{2}$  vie mesurée dans des marais traités est de l'ordre de 14 h (ALZIEU, 1973, non publié).

#### *Traitements forestiers.*

Le dimilin a été homologué en France pour le traitement contre la chenille processionnaire du pin à la dose de 0,3 kg/ha, soit 75 g de matière active/ha. Les zones littorales humides (bassins, étangs, marais, claires ostréicoles...) ne faisant pas l'objet du traitement phytosanitaire, leur contamination par le dimilin ne peut se faire qu'indirectement par l'intermédiaire des eaux de ruissellement, des retombées atmosphériques lors des traitements aériens, d'épandages accidentels.

Les apports correspondant aux deux premières sources sont difficiles à estimer quantitativement, mais il y a tout lieu de penser qu'ils sont très nettement inférieurs à ceux provenant d'un épandage accidentel direct. On peut, par conséquent, évaluer le risque maximal pour la faune marine à partir des teneurs théoriques en diflubenzuron résultant du déversement de dimilin dans un milieu fermé tel qu'une claire ostréicole. En admettant que la totalité du diflubenzuron se trouve en solution et que la profondeur d'eau dans la claire soit de 0,50 m, ces teneurs sont voisines de 15 µg/l et donc sans effets notables sur la faune marine.

Il semble que l'utilisation du dimilin pour la lutte contre la chenille processionnaire du pin en zone littorale ne présente pas de risques de toxicité ou de contamination des élevages conchylicoles. Cette conclusion rejoint celle à laquelle nous avons conduits les essais sur les formulations à base de *Bacillus thuringiensis*. Il apparaît donc que les traitements contre les chenilles processionnaires du pin, pratiqués avec l'un des deux types d'insecticides mis actuellement à la disposition des utilisateurs, ne mettent pas en péril les élevages conchylicoles.

*Manuscrit déposé le 6 juin 1978.*

---

(1) Dimilin : A new insecticide interfering with chitin deposition. — Technical information, 7th edition.

BIBLIOGRAPHIE

- ALZIEU (Cl.), DE BARJAC (H.) et MAGGI (P.), 1975. — Tolérance de la faune marine à *Bacillus thuringiensis*. — *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit.*, n° 250 : 11-18.
- CUNNINGHAM (P.A.), 1976. — Effects of dimilin (TH 6040) on reproduction in the brine shrimp, *Artemia salina*. — *Environ. Entomol.*, **5** (4) : 701-706.
- DE KREUK (J.F.), 1976. — Determination of the degradability of organic compounds. — D 76/55.
- MAINI (P.) et DESEÖ (K.V.), 1976. — Thin layer chromatographic detection of diflubenzuron in biological samples. — *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, **16** (6) : 702-708.
- METCALF (R.L.), LU (P.Y.) et BOWLUS (S.), 1975. — Degradation and environmental fate of 1 — (2,6-difluorobenzoyl) — 3 — (4-chlorophenyl) urea. — *J. Agric. Food Chem.*, **23** (3) : 359-364.
- MILLER (R.W.), CORLEY (C.) et HILL (K.R.), 1975. — Feeding TH 6040 to chickens : effect on larval house flies in manure and determination of residue in eggs. — *Journal of Economic Entomol.*, **68** (2) : 181-182.
- POST (L.C.) et VINCENT (W.R.), 1973. — *Naturwissenschaften*, **60** : 431.
- SCHAEFER (C.H.) et DUPRAS Jr (E.F.), 1976. — Factors affecting the stability of dimilin in water and the persistence of dimilin in field waters. — *J. agric. Food Chem.*, **24** (4) : 733-739.
- VERLOOP (A.) et FERRELL (C.D.), 1977. — Benzoylphenyl ureas. A new group of larvicides interfering with chitin deposition. — *A.C.S. Symposium series*, n° 37. Pesticide chemistry in the 20th century. J.R. PLIMMER, Edit. : 237-270.
- WOROBAY (B.L.) et WEBSTER (G.R.B.), 1977. — Gas-liquid chromatographic determination of diflubenzuron (dimilin) in water as its trifluoroacetyl derivative. — *Journal of the A.O.A.C.*, **60** (1) : 213-217.