

Effets de six huiles essentielles sur les œufs et les larves de *callosobruchus maculatus* F. (coleoptera : bruchidae)

Guillaume K. KETOH*, Isabelle A. GLITHO*,
Yaovi NUTO*, Honoré K. KOUMAGLO*

Introduction

L'une des préoccupations majeures dans les systèmes agricoles traditionnels est le remplacement progressif des pesticides de synthèse par des substances naturelles moins polluantes, moins toxiques et moins coûteuses pour conserver les stocks de niébé (*Vigna unguiculata* Walp.). Les pesticides de synthèse ont été adoptés par les petits exploitants agricoles à cause de leurs effets immédiats et évidents (FATOPE *et al.*, 1995). Les moyens traditionnels de conservation dont dispose le paysan (sable, cendres de bois ou diverses parties de plantes odorantes) sont aussi efficaces mais seulement pour la protection de petits stocks destinés essentiellement aux semis.

L'efficacité des plantes insecticides est relative. Elle dépend de la quantité de graines à stocker, des organes de la plante utilisés mais également de la toxicité réelle de ces plantes (DELOBEL et MALONGA, 1987).

De nombreux travaux ont porté sur l'amélioration des formes d'utilisation des plantes qui permettent de renforcer et de rentabiliser leur activité insecticide (De LUCA, 1980 ; ISMAN, 1994). L'objectif est d'améliorer les techniques traditionnelles basées sur l'utilisation des ressources végétales renouvelables pour une meilleure gestion des déprédateurs dans les stocks de niébé de plus grande importance. Certaines observations ont montré que l'extrait brut éthanolique (TIERTO-NIBER *et al.* 1992), hexa-

nique (NUTO, 1995) ou à l'éther de pétrole (GAKURU et FOUA-BI, 1996) de matériel végétal possède une toxicité effective vis-à-vis des ravageurs de stocks. D'autres résultats indiquent que les huiles essentielles (HE) extraites de plantes odorantes ont une activité insecticide indéniable vis-à-vis de *Callosobruchus maculatus* F. (GLITHO *et al.*, 1997 ; GAKURU et FOUA-BI, 1995). Ces HE agissent par diffusion. C'est ce qui leur permet d'atteindre toutes les interstices dans la masse de graines stockées. Elles peuvent donc être utilisées en fumigation et leur emploi est facile. Selon KOUMAGLO (1992) la technologie de leur extraction est simple et accessible à tous les niveaux.

Pour une bonne gestion des ravageurs, il est important de préciser les stades cibles afin d'établir une concordance chronologique entre les périodes de traitement et le stade nuisible du ravageur (SCHMAEDICK et NYROPS, 1995). Ceci limiterait les dégâts tout en préservant la valeur marchande des graines de niébé.

Dans le présent travail, nous avons cherché à vérifier l'effet de six HE dont nous avons démontré la toxicité pour les adultes de *C. maculatus* (GLITHO *et al.*, 1997), sur les œufs frais et larves néonates de cet insecte. Ces stades, caractérisés par leurs échanges respiratoires plus ou moins intenses, constituent les formes externes ou stades cibles pré-nuisibles chez l'espèce.

Matériel et méthodes

Les tests ont été effectués dans les conditions de température de $28,0 \pm 2,0^\circ$ C et de photopériode naturelle. Plusieurs concentrations de chacune des six HE ont été testées : 33,3, 16,6, 10,0 et 6,6 μ l/l. Ce qui correspond aux prises de 100, 50, 30, et 20 μ l par rapport au volume de l'enceinte. Ces HE sont des extraits bruts obtenus par entraînement à la vapeur de

cinq plantes du Togo (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. type citral, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle type citronnellal, *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng. type pipéritone, *Eucalyptus citriodora* Hook type cytronnellal. et *Lippia multiflora* Moldenke.) type citral. L'HE du Lavandin (*Lavandula sp*) type acétate de

linalyle avec 30 % de linalool a été achetée dans le commerce. L'identification chimique des constituants de chaque huile a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (type Varian 3300 et Hewlett-Packard MSD 5972 à 70eV).

Laboratoire d'Entomologie Appliquée

* Laboratoire des extraits végétaux et arômes naturels, Faculté des Sciences, Université du Bénin B.P. 1515 Lomé - TOGO

Le chromatographe est équipé d'une colonne apolaire DB-5 (30m x 0.25mm) et d'une colonne polaire upelcowax 10.

Nous avons introduit dans une enceinte confinée (bocal en verre recuit de 3 litres) des graines de niébé *Vigna unguiculata* Walp., variété Gléi (black eye local) portant 100 oeufs ou 100 larves néonates. Nous introduisons ensuite dans le bocal une charge unique d'HE portée par un disque de papier filtre Whatman pour favoriser le mode d'action par inhalation. Ce disque n'est pas mis en contact avec

Résultats

Effets des HE sur le développement des œufs frais

Le tableau I résume les observations et donne les moyennes de trois répétitions \pm déviation standard.

Les HE de *C. citratus*, *C. nardus* et *L. multiflora* inhibent le développement de 100 % des œufs quelle que soit la concentration testée. Les œufs affectés ont leur contenu ovulaire dissous mais le chorion reste intact.

L'ensemble des résultats obtenus dans nos conditions expérimentales montre que toutes les HE testées ont une nette action larvicide sur les larves néoformées. En effet, si nous considérons le témoin, nous constatons qu'il n'y a pas de mortalité à ce stade et que 100 % des larves arrivent à pénétrer dans les graines.

Après traitement par les HE, nous notons des taux de mortalité très élevés pouvant varier de 60 à 100 % en fonction des HE utilisées et en fonction de leur concentration.

Tableau I. Activité ovicide de six HE en fonction de la concentration.

Huiles essentielles	0 μ l/l	Pourcentage moyen d'œufs éclos (%)			
		6,66 μ l/l	10,00 μ l/l	16,66 μ l/l	33,33 μ l/l
<i>C. citratus</i>	-	0,0 \pm 0,0 f	0,0 \pm 0,0 f	0,0 \pm 0,0 f	0,0 \pm 0,0 f
<i>C. nardus</i>	-	0,0 \pm 0,0 f	0,0 \pm 0,0 f	0,0 \pm 0,0 f	0,0 \pm 0,0 f
<i>C. schoenanthus</i>	-	26,6 \pm 3,2 e	27,3 \pm 8,4 e	10,6 \pm 3,8 f	0,0 \pm 0,0 f
<i>E. citriodora</i>	-	70,6 \pm 17,7 c	11,6 \pm 3,8 f	0,3 \pm 0,6 f	0,0 \pm 0,0 f
<i>Lavandula sp</i>	-	81,3 \pm 12,6 b	57,3 \pm 10,7 d	14,3 \pm 3,5 f	0,0 \pm 0,0 f
<i>L. Multiflora</i>	-	0,0 \pm 0,0 f	0,0 \pm 0,0 f	0,0 \pm 0,0 f	0,0 \pm 0,0 f
Témoin	96,6 \pm 4,5 a	-	-	-	-

les graines. Un témoin sans huile essentielle a été monté pour chaque essai. Toutes les graines ont été maintenues en observation pendant deux semaines. Les œufs ou leurs chorions ont été ensuite retirés et examinés à la loupe binoculaire NIKON SMZ 2B.

Nous avons dénombré les œufs éclos ou les larves ayant pénétré dans les graines dans chaque essai. Nous avons aussi noté le stade auquel l'œuf affecté a avorté ou celui où le développement de larve a été interrompu.

Chaque test a été répété trois fois. Les résultats sont exprimés sous la forme : moyenne \pm déviation standard. Ils ont été traités par l'analyse de variance (ANOVA). La comparaison des moyennes entre lignes et colonnes a été faite par le test de NEWMAN et KEULS au seuil de 5 %. Les moyennes accompagnées de mêmes lettres ne présentent pas de différence significative.

La membrane vitelline apparaît également intacte au microscope photonique. Les trois autres HE (*C. schoenanthus*, *E. citriodora* et *Lavandula sp.*) sont efficaces à 100 % à la concentration de 33,3 μ l/l. Elles empêchent le développement de tous les œufs alors que dans le témoin, 96,6 \pm 4,5 % des œufs ont éclos. A des concentrations plus faibles, (16,6 μ l/l à 6,66 μ l/l), elles sont encore efficaces et les différences avec le témoin sont significatives au seuil de 5 %. Cependant elles ne présentent qu'un effet d'inhibition partiel dont l'intensité varie en fonction des huiles et des concentrations.

Effets des HE sur le développement des larves néoformées

Nous avons noté dans le tableau II les résultats du suivi de la pénétration des larves dans les graines.

Toutes les HE sont efficaces à la concentration de 33,3 μ l/l qui entraîne la mort de toutes les larves. Celles-ci sont desséchées et déformées dans le chorion qui reste intact.

Ces huiles conservent, presque toutes, leur efficacité à la concentration de 16,6 μ l/l puisque les différences ne sont pas significatives par rapport à la concentration de 33,3 μ l/l. Même les HE de *C. nardus* et *L. multiflora* qui montrent des différences significatives provoquent la mort de plus de 93 % des larves traitées.

A la plus faible concentration, les HE ont encore une très bonne activité inhibitrice et empêchent au moins 60 % de larves de poursuivre leur développement.

Tableau II. Activité des HE sur les larves néoformées en fonction de la concentration.

	Pourcentage moyen de larves ayant pénétré (%)				
	0µl/l	6,66µl/l	10,00µl/l	16,66µl/l	33,33µl/l
<i>C. citratus</i>	-	26,3 ± 5,0 c	9,3 ± 3,7 defg	0,6 ± 0,5 g	0,0 ± 0,0 g
<i>C. nardus</i>	-	19,3 ± 3,2 cd	11,3 ± 6,0 defg	7,3 ± 2,5 efg	0,0 ± 0,0 g
<i>C. schoenanthus</i>	-	5,6 ± 4,5 fg	0,0 ± 0,0 g	0,6 ± 1,1 g	0,0 ± 0,0g
<i>E. citriodora</i>	-	41,6 ± 10,6 b	8,6 ± 2,1 defg	0,0 ± 0,0 g	0,0 ± 0,0 g
<i>Lavandula sp</i>	-	17,6 ± 13,5 cde	3,3 ± 1,5 g	2,0 ± 1,0 g	0,0 ± 0,0 g
<i>L. Multiflora</i>	-	39,0 ± 9,1 b	15,3 ± 9,5 def	5,3 ± 2,0 efg	0,0 ± 0,0 g
Témoin	100,0 ± 0,0 a	-	-	-	-

Discussion

Les taux d'éclosion des œufs et les taux de pénétration des larves néoformées dans les graines sont très élevés dans les bocal-témoins. Cela signifie que notre souche de *C. maculatus*, qui est connu pour sa forte fécondité (SIABI, 1996), bénéficie aussi de la très bonne fertilité de ses œufs et de l'efficacité de pénétration de ses larves dans les graines. En présence de vapeurs d'HE, le développement des œufs et des jeunes larves est affecté. Les HE dans nos conditions de laboratoire ont donc des activités ovicide et larvicide certaines.

Si, comme le préconisent, EWETE *et al.* (1996), le fort taux de mortalité provoqué dans une population de ravageurs traités est un indicateur de la toxicité du produit utilisé, nous pouvons classer les différentes HE choisies pour ce travail. En effet, en considérant l'activité ovicide, nous avons les HE très toxiques dont l'efficacité est totale déjà à faible concentration et les HE dont l'effet augmente avec la concentration.

La concentration de 6,6 µl/l nous permet de distinguer, pour l'activité ovicide, trois catégories d'HE :

- les HE qui pourraient être utilisées à faible concentration dans la gestion de tous les œufs de *C. maculatus*. Ces HE, très toxiques, provoquent la dissolution du contenu ovulaire.

Ce sont les HE de plantes de type citral (*C. citratus* et *L. multiflora*).

- les HE un peu moins toxiques qui éliminent à faible concentration au moins 70 % des œufs frais de *C. maculatus* et qui pourrait éventuellement être utilisée dans la gestion des œufs du déprédateur. C'est le cas de l'HE de *C. schoenanthus* contenant un fort taux de pipéritone.

- les HE peu toxiques qui sont efficaces seulement à forte concentration. Ce sont les HE des plantes de type citronnellal (*E. citriodora*) ou acétate de linalyle (*Lavandula sp*).

Cependant, ce constat ne doit pas amener à penser que la toxicité d'une plante est obligatoirement liée à la nature du composé dominant. En effet, l'HE de *C. nardus* est beaucoup plus toxique que celle de *E. citriodora* bien que toutes les deux soient de type citronnellal. La présence de composés synergiques peut renforcer l'activité du principe actif (NUTO, 1995).

L'activité ovicide des huiles s'explique par leur pouvoir pénétrant ou par la toxicité directe de leurs composants (DON PEDRO, 1989). La toxicité des vapeurs d'HE de *Acorus calamus* sur les œufs de *Callosobruchus chinensis* L a été signalée par SCHMIDT *et al.* (1991) qui ont indiqué que les HE avaient une action stérilisante sur les œufs.

Les HE entravent aussi le développement des larves des insectes. Toutes les HE que

nous avons testées se sont révélées être de bons agents de contrôle des jeunes larves de *C. maculatus* dans nos conditions expérimentales puisqu'elles sont efficaces même à faible concentration. Cependant, nous pouvons considérer que l'HE de *C. schoenanthus*, signalée antérieurement comme ayant la meilleure action contre les adultes (GLITHO *et al.*, 1997), a aussi la meilleure efficacité larvicide. Elle occupe la deuxième place parmi les six HE dont nous avons testées l'activité ovicide. Cette plante peut donc être considérée, dans les limites de nos conditions expérimentales, comme le meilleur agent végétal de contrôle de l'ensemble des stades externes de développement de *C. maculatus*, espèce déprédatrice du niébé.

L'activité larvicide observée avec les HE est généralement due à une inhibition des régulateurs de croissance. SCHMUTTERER (1992) a attribué cette inhibition aux juvocimènes (phytojuvénoïdes analogues à l'hormone juvénile des insectes) contenues dans HE de *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). L'activité larvicide des HE que nous avons utilisées est donc probablement liée à leur richesse en terpènes qui sont des composés proches de l'hormone juvénile.

Le fait que les HE testées soient efficaces à la fois sur les adultes, les œufs et les larves fait penser qu'elles agissent par voie respiratoire. Sur les œufs de

C. maculatus, les vapeurs d'huiles agissent à travers le tube respiratoire de l'oeuf décrit par CREDLAND (1992) et WHIGHTMAN et SOUTHGATE (1982). BERNARD *et al.* (1989) ont signalé que les composants d'HE comme le dillapiol extrait de *Artemisia scoparia* (Asteraceae) agissent sur la chaîne respiratoire en inhibant l'activité des mono-oxygénases chez l'insecte traité. DON PEDRO (1989) explique que l'activité respiratoire des œufs de *C. maculatus* est six fois plus faible que celle des larves néoformées. Ceci traduit une faible activité des mono-oxygénases chez les œufs et donc une plus forte tolérance aux produits qui inhibent ces enzymes. D'après DUCOM (1996), les œufs considérés comme un stade quiescent, sont plus tolérants vis-à-vis des insecticides de synthèse.

Nos résultats indiquent que l'utilisation des huiles en fumigation pour le contrôle des populations de *C. maculatus* est possible. Les HE sont en majeure partie constituées de matières volatiles et d'après BOURREL *et al.* (1995), le traitement par contact ne leur est pas applicable. En effet, le traitement par contact ne prend pas en compte les problèmes liés à l'évaporation des principes actifs, d'où les difficultés rencontrées pour déterminer la concentration efficace. La fumigation permet de traiter de grandes masses de graines sans les déplacer. FRENCH (1985) souligne que ce sont les propriétés comme la volatilité, la nature éphémère et la biodégradation qui constituent les avantages d'une utilisation des HE comme pesticides. □

Remerciements

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance à Monsieur SANBENA Banibéa Antoine, à Monsieur KONOU Komi René, techniciens, au Département de Biologie Animale, et Monsieur DOTSE

Kokouvi, technicien au Laboratoire des Extraits Végétaux et Arômes Naturels, Faculté des Sciences de l'Université du Bénin, pour leur assistance technique.

Références bibliographiques

- BERNARD C-B., ARNASON J. T., PHILOGENE B.J.R., LAM J. and WADELL T. 1989. Effect of ligands and other secondary metabolites of the Asteraceae on the mono-oxygenase activity of European corn borer. *Phytochemistry*, vol. 28. 5, p 1373-1377.
- BOURREL C., VILAREM G., MICHEL G. et GRASET A. 1995. Etude des propriétés bactériostatiques et fongistatiques en milieu solide de 24 huiles essentielles préalablement analysées. *Rivista Italiana*, EPPOS, p 3-12.
- CREDLAND P.F. 1992. The structure of bruchids eggs may explain the ovicidal effect of oils. *J. Stored Prod. Res.* vol. 28, N°1 pp.1-9.
- DELOBEL A. and MALONGA P. 1987. Insecticidal properties of six plant materials against *Caryedon serratus* (Ol.) *J. Stored Prod. Res.* vol.23, 173-176.
- DON PEDRO K.N. 1989. Mode of action of fixed oils against eggs of *Callosobruchus maculatus* Fab. *Pestic. Sci.* 26, p.107-116.
- DUCOM P. 1996. Lutte chimique contre les insectes des grains stockés. In Manuel Post-Récolte : Principes et Applications en zone tropicale. AUPELF p 105-140.
- EWETE F. K., ARNASON J. T., LARSON J. and PHILOGENE J.R. 1996. Biological activities of extracts from traditionally used Nigerian plants against the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80: 531-537.
- FATOPE M.O., NUHU A.M., MANN A. and TAKEDA Y. 1995. Cowpea weevil bioassay a simple prescreen for plants with grain protectant effects. *Intern. Journ. of Pest Management* 41 : 2, 84-86p.
- FRENCH R. C. 1985. The bioregulatory action of flavour compounds on fungal spores and other propagules. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 23 : 175-199.
- GAKURU S. et FOUA-BI K. 1995. Effet comparé des huiles essentielles de quatre espèces végétales contre la bruche du niébé (*Callosobruchus maculatus* Fab.) et le charançon du riz (*Sitophilus orizae* L.). *Tropicicultura* 13, 4, 143-146p.
- GAKURU S. et FOUA-BI K. 1996. Effet d'extraits de plantes sur la bruche du niébé

(*Callosobruchus maculatus* Fab.) et le charançon du riz (*Sitophilus orizae* L.). *Cahiers Agriculture* ; vol. 5. N°1 : p.39-42.

GLITHO I.A., KETOH K.G. et KOUMAGLO H.K. 1997. Effets et quelques huiles essentielles sur l'activité reproductrice de *Callosobruchus maculatus* Fab. *Annales de l'Université de Ouagadougou Série B*, Vol., 5 p. 174-185.

ISMAN M.B. 1994. Botanical insecticides. *Pesticides outlook* 26-31.

KOUMAGLO H. K. 1992. Quelle alternative pour le développement du monde rural. La Valorisation des Production Végétales : Cas des Produits Aromatiques et des Huiles Essentielles. Réunion Scientifique Internationale. IRST Butare, p.263-268.

LUCA (de) Y. 1980. Produits d'origine végétale opposables aux Bruchidae (Col.) *Estrattoda : Frustula. Entomologica Nuova Serie*, vol.II (XV) 11p.

NUTO Y. 1995. Synergistic action of co-occurring toxins in the root bark of *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Rutaceae) against the cowpea beetle *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae). Thesis of Ph.D.S.U.N.Y. Syracuse, New York 107p.

SCHMAEDICK M.A. and NYROP J.P. 1995. Method for sampling arthropod pests with uncertain phenology with application to spotted Tentiform leaf-miner (Lepidoptera : Gracillariidae). *J. Econ. Entomol.* 88 (4) 875-889p.

SCHMIDT G.H., RISHA E.M. and EL-NAHAL A.K.M. 1991. Reduction of progeny of SOMÉ stored-product Coleoptera by vapours of *Acorus calamus* oil. *J. stored Prod. Res.* vol. 27, N.2, p 121-127.

SCHMUTTERER H. 1992. Higher plants as source of novel pesticides In *Insecticides : Mechanism of action and resistance*. Intercept Andover p.3-14.

SIABI K. M. 1996. Activité reproductrice de *Callosobruchus maculatus* (Coléoptera : Bruchidae) sur deux variétés de niébé (*Vigna unguiculata* Walp.) : Impact sur la valeur marchande du niébé au Togo. Mémoire d'Ingénieur des Travaux Université du Bénin 53p.

TIERTO-NIBER B., HELLENUS J. and VARIS A.-L. 1992. Toxicity of plant extracts to three storage beetles (Coleoptera). *J. Appl. Ent.* 113, 202-208.

WIGHTMAN J.A. and SOUTHGATE B. J. 1982. Egg morphology, host and probable regions of origin of the bruchids (Coleoptera : Bruchidae) that infest stored pulses - an identification aid. *New Zealand Journal of Exp. Agric.* Vol. 10 p.95-99.

Résumé

Effets de six huiles essentielles sur les œufs et les larves de *callosobruchus maculatus* f. (coleoptera : bruchidae)

Six huiles essentielles (HE) à activité insecticide ont été testées par fumigation sur les œufs et sur les larves néoformées de *Callosobruchus maculatus* F. à différentes concentrations. Ces HE extraites pour la plupart de plantes médicinales du Togo (*Cymbopogon citra.us* D.C. Stapf. type citral, *Cymbopogon nardus* L. Rendle type citronnellal, *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. type pipéritone, *Eucalyptus citriodora* Hook type citronnellal et *Lippia multiflora* Moldenke type citral) ont été utilisées en milieu confiné dans les conditions de température de $28,0 \pm 2,0^\circ$ C et de photopériode naturelle. L'HE du Lavandin (*Lavandula* sp), achetée dans le commerce, a servi de substance référence.

Le développement de tous les œufs frais a été inhibé par les HE testées à la concentration de $33,3 \mu\text{l/l}$. Trois des HE testées (*C. citratus*, *C. nardus* et *L. multiflora*) sont très efficaces même à la plus faible concentration utilisée ($6,6 \mu\text{l/l}$). Les trois autres sont moins efficaces à cette faible concentration mais ont montré néanmoins une activité ovicide significative par rapport au témoin.

Sur les larves néoformées, toutes les HE se sont révélées très efficaces à la concentration de $33,3 \mu\text{l/l}$. Aucune larve n'a pu pénétrer dans la graine. A la plus faible concentration ($6,6 \mu\text{l/l}$), seules trois des HE (*C. nardus*, *C. schoenanthus* et *Lavandula* sp) ont empêché plus de 80 % des larves de pénétrer dans la graine.

Mots clés : huiles essentielles (HE), *Callosobruchus maculatus*, activité ovicide, activité larvicide, milieu confiné, fumigation.

Abstract

Six essential oils (EO) with insecticidal activity were tested by fumigation on eggs newly laid and on newly formed larvae of *Callosobruchus maculatus* F. at different concentrations. Most of EO were extracted from medicinal plants (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf.type citral, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle type citronnellal, *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng. type pipéritone, *Eucalyptus citriodora* Hook type citronnellol. and *Lippia multiflora* Moldenke.) type citral of Togo. EO of Lavandin (*Lavandula* sp) obtained in the commerce was used as a reference substance. The effects of EO were investigated in confined atmosphere under the temperature condition of $28.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ and natural photoperiod.

The development of treated eggs was inhibited by all EO tested at $33.3\mu\text{l/l}$. At the lowest concentration ($6.6 \mu\text{l/l}$), all EO had shown a significant ovicidal activity compared to the control but three of them (*C. citratus*, *C. nardus* and *L. multiflora*) were very efficient at this concentration.

On the newly formed larvae, the EO were also very efficient at $33.3 \mu\text{l/l}$. No larvae entered into the cowpea seed. At $6.6\mu\text{l/l}$, only three EO (*C. nardus*, *C. schoenanthus* and *Lavandin*) had prevented more than 80% of the larvae from entering into the grain.

Key words: essential oils, *Callosobruchus maculatus*, ovicidal activity, larvicidal activity, confined atmosphere, fumigation.