EFFETS DU MANCOZEBE SUR LA MICROFLORE DES SOLS DE VIGNOBLE ET PARTICIPATION DES MICROORGANISMES A SA DEGRADATION *

B. DONECHE et G. SEGUIN
Institut d'Œnologie - Université de Bordeaux II
351, Cours de la Libération, 33405 Talence (France)

INTRODUCTION

Reconnu comme fongicide en 1961 sous le nom de Dithane M-45 et commercialisé en 1962 sous l'appellation de « mancozèbe », le produit de coordination de l'ion zinc avec l'éthylénebisdithiocarbamate de manganèse est utilisé pour le traitement des organes aériens de la vigne, des arbres fruitiers et des cultures maraîchères. En conséquence, la plupart des travaux réalisés sur les dithiocarbamates, dont le « mancozèbe » est le dérivé le plus récent, ont eu pour objet la recherche d'une phytotoxicité éventuelle et la mise en évidence de leur dégradation sur les organes végétaux traités. Mais outre le lessivage des organes aériens, son application à la protection des semences et à la désinfection des sols est susceptible de créer un nouveau danger pour les sols cultivés.

Quelques chercheurs s'inquiètent actuellement des déséquilibres possibles de la microflore tellurique en présence de ces fongicides, qui risquent d'altérer la fertilité biologique des sols (SAIVE et **al.**, 1974). Mais la majorité de ces études sont faites dans des conditions telles que l'on peut difficilement extrapoler les résultats obtenus aux phénomènes qui se déroulent effectivement dans les sols de vignobles. Ces essais portent en effet sur les réactions de certains groupements fonctionnels à des doses élevées de substances actives (500 mg par kg), doses qui ne se retrouvent que dans le cas très particulier des sols de serre.

Des essais préalables concernant l'action du « mancozèbe » sur la microflore tellurique **in vitro** (DONECHE, 1974, et résultats non publiés)

* Ce travail a été réalisé avec la participation financière du Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux.

avaient montré que la présence du fongicide s'accompagne d'une diminution plus ou moins importante du nombre de microorganismes pour tous les groupements physiologiques (notamment pour les populations impliquées dans la minéralisation de l'azote) avec une inhibition plus marquée des germes aérobies par rapport aux germes anaérobies. On pouvait même noter la prolifération des bactéries assurant la minéralisation du soufre organique en anaérobiose.

DISPOSITIF D'ETUDE

Il est très délicat de mettre en évidence les effets d'un pesticide sur la microflore tellurique en raison de la complexité du système « Pesticide-Microorganismes-Sol ». La population étant distribuée de façon très hétérogène au niveau de microhabitats et le nombre des méthodes d'évaluation de l'activité microbienne in situ étant encore très limité, il nous a semblé préférable de recréer au laboratoire un écosystème microflore-sol, dont nous pourrions contrôler tous les paramètres.

Les échantillons de sols, après tamisage à 2 mm et homogénéisation, ont été disposés dans des cuves de verre, sur 10 cm de profondeur, à raison de 4 kg par cuve. Au cours de cette opération, la teneur en eau du sol a été portée à 50 p. 100 de la capacité de rétention avec de l'eau distillée pour les échantillons témoins et avec une suspension aqueuse de « mancozèbe », de manière à apporter 10 mg de produit par kg de sol dans les échantillons traités. Il faut noter que le fongicide est incorporé au sol et non pulvérisé en surface, ce qui correspond davantage aux conditions pratiques de la viticulture (travaux culturaux saisonniers).

Les parois des cuves ont été obscurcies au moyen de feuilles d'aluminium afin de mieux reconstituer les conditions naturelles. L'étude a été faite à température ambiante (de 18 à 25 °C) et l'humidité maintenue constante par pesées périodiques. Un prélèvement global de 300 g, destiné aux diverses analyses, a été réalisé à intervalles successifs (5, 15, 30, 60 et 90 jours). Dans ce but, des prises de 2 g sont effectuées dans toute la masse de terre jusqu'à obtention d'un échantillon de 300 g, qui est homogénéisé avant d'être réparti en fractions aliquotes pour les différents dosages.

Les déterminations peuvent se classer de la façon suivante :

a) Dosage des résidus de « mancozèbe » par réaction colorimétrique du sulfure de carbone libéré après hydrolyse acide (KEPPEL, 1971).

b) Mesure de l'activité globale des microorganismes :

— dosage du gaz carbonique émis par le sol selon la technique d'Isermeyer (ISERMEYER, 1952).

— Détermination de l'activité deshydrogénasique (SCHAEFER 1963).

TABLEAU I

Caractères analytiques des sols étudiés

Sols		A	B	C	D	E	F
Répartition géographique		Médoc	Graves	Sauternes	Entre-deux-Mers	Bourgeais	Saint-Emilion
Graviers	p. 100	53,6	16,4	55,6	0	0	—
Terre fine	p. 100	46,4	83,6	44,4	100	100	—
Sable grossier	p. 100	66,9	63,4	57,6	4,2	21,0	32,2
Sable fin	p. 100	12,9	17,2	23,8	10,3	19,0	16,0
Limon grossier	p. 100	5,8	9,5	4,9	41,0	8,2	9,4
Limon fin	p. 100	6,5	5,2	4,3	29,2	19,7	21,7
Argile	p. 100	7,4	4,3	8,1	13,8	30,8	18,0
Matière organique	p. 100	1,7	2,1	1,2	1,5	2,0	2,2
Carbone	p. 100	0,96	1,20	0,67	0,90	1,18	1,30
Azote	p. 100	0,076	0,076	0,046	0,097	0,103	0,128
C/N		12,6	15,8	14,5	9,3	11,5	10,2
Humidité équivalente	p. 100	10,0	11,4	11,9	20,6	20,3	21,6
Complexe absorbant K+	mEq p. 100 g	0,23	0,23	0,35	0,68	0,80	2,28
Complexe absorbant Na+	mEq p. 100 g	0,15	0,10	0,15	0,15	0,45	0,48
Complexe absorbant Mg++	mEq p. 100 g	0,05	0,15	0,63	0,78	0,58	0,48
Complexe absorbant Ca++	mEq p. 100 g	0,80	2,20	5,70	+	+	+
Complexe absorbant S	mEq p. 100 g	1,51	2,68	6,83	+	+	+
Complexe absorbant T	mEq p. 100 g	5,00	5,88	5,37	8,14	15,20	14,71
Complexe absorbant V	p. 100	30	45	Sat.	Sat.	Sat.	Sat.
pH dans eau		4,7	6,0	7,5	8,0	8,1	8,4
pH dans KCl N/10		3,7	4,8	6,9	—	—	—
Cu échangeable mg/kg		86,5	7,0	20,0	19,0	5,5	40,5
Cu total mg/kg		180,0	78,0	66,0	118,0	92,0	316,0
Calcaire total	p. 100	0	0	2,4	2,0	13,6	42,8
Calcaire actif	p. 100	0	0	0,3	0,2	3,2	10,1
Fer libre	p. 100	0,26	0,18	0,42	0,60	0,71	0,60
P_2O_5	p. 100	0,044	0,042	0,027	0,014	0,010	0,026

c) Numération des grands groupes microbiens du sol (microflore totale, algues, actinomycètes, champignons).

d) Numération des groupements fonctionnels (cycle de l'azote, du carbone et du soufre) selon la méthode de POCHON et TARDIEUX (1962).

e) Mesure d'activités enzymatiques libres (Uréase d'après HOFFMANN et TEICHER, 1961 et Saccharase d'après HOFFMANN et PALLAUF, 1965).

f) Détermination de l'activité ammonifiante et de l'azote minéralisable selon DROUINEAU et LEFEVRE (1949).

Comme l' « effet biologique » d'un pesticide dépend fortement de la nature du sol concerné (KREUTZER, 1965) cette étude a été faite sur six sols représentatifs du vignoble bordelais, différenciés par leur origine géographique, leur pH, leur richesse en matière organique et leur texture (Tableau I).

Afin de dégager de ces travaux des conclusions applicables à la majorité des sols de vignoble de la région, nous ne donnerons ici que les résultats correspondant à la moyenne des six sols, sans détailler les particularités propres à chacun d'eux.

SIGNIFICATION DES RESULTATS

Les résultats des dosages chimiques (dégagement de gaz carbonique, activité ammonifiante et déshydrogénasique, activités enzymatiques libres) ont été soumis à l'analyse statistique. Dans la majorité des cas, il apparaît une différence significative au seuil de probabilité : 0,01 entre les valeurs obtenues sur les sols témoins et sur les sols traités par le « mancozèbe ».

Les résultats des analyses microbiologiques (numérations) sont plus difficiles à interpréter : les variations de population d'un sol à un autre et l'imprécision des numérations interdisent l'utilisation de méthodes statistiques. Ainsi les essais de reproductibilité effectués par différents auteurs montrent que le nombre de germes par gramme de terre sèche peut varier, lors de répétitions sur un même échantillon, de 1 à 3 à l'intérieur d'une puissance. Il a donc été nécessaire d'établir arbitrairement une échelle de signification à partir du rapport entre le nombre de germes en sol témoin et le nombre de germes en sol traité :

— Pour un rapport inférieur ou égal à 4, l'inhibition (ou la stimulation) sera considérée comme non « significative ».

— Pour un rapport compris entre 4 et 12, l'inhibition (ou la stimulation) sera « nette », car elle traduira un phénomène réel bien que peu accentué.

— Pour un rapport supérieur à 12, il y aura une inhibition (ou une stimulation) « significative ».

Sur la figure 10 représentant la durée des effets du « mancozèbe » sur l'ensemble des fonctions étudiées, seules les inhibitions et stimulations, « significatives » ont été prises en considération. Dans le cas contraire, le symbole + indique une tendance « nette » à la stimulation, et le symbole —, à l'inhibition.

EFFETS DU « MANCOZEBE » SUR LA MICROFLORE TELLURIQUE

Evolution de l'activité biologique globale

La numération de la microflore totale, représentée sur la figure 1 a, met en évidence un effet dépressif marqué, aussitôt après le traitement. Puis il y a recolonisation du sol par les germes, de façon très progressive, puisqu'il faut attendre au moins trois mois pour que la micropopulation retrouve une densité voisine de la normale. Sans que cela soit nécessaire pour expliquer la prolifération des micro-organismes résistants, on peut noter que les cellules tuées par le « mancozèbe » libèrent des composés organiques.

Lors de la disparition du fongicide, les espèces inhibées se développent de nouveau et exercent des effets antagonistes sur les germes résistants, établissant ainsi un nouvel équilibre.

Cette diminution initiale du nombre de germes se retrouve au niveau de l'activité biologique globale. Dans le cas de l'activité deshydrogénasique (fig. 1 e) elle se prolonge jusqu'au troisième mois tandis que le dégagement de gaz carbonique (fig. 2 a) est « significativement » stimulé à partir du 30e jour. Cela laisse supposer que les micro-organismes utilisent préférentiellement, pour leur métabolisme, les voies de la respiration anaérobie et des fermentations. On sait que lors de l'oxydation des substrats organiques, et cela quelle que soit la voie métabolique empruntée, il y a libération de molécules de gaz carbonique mais ce n'est que

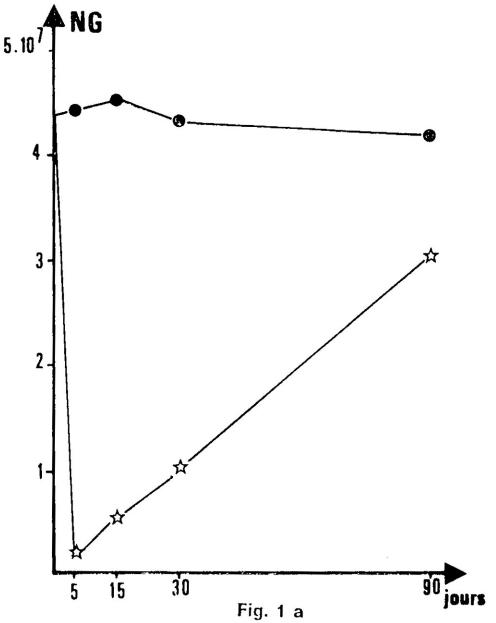


Fig. 1 a

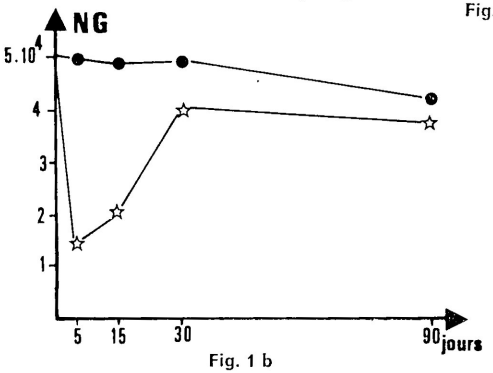


Fig. 1 b

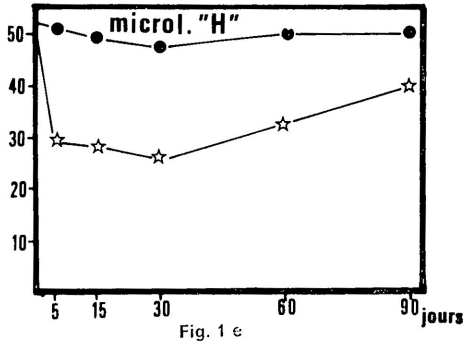


Fig. 1 e

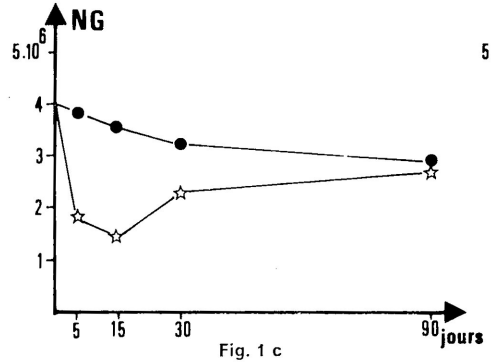


Fig. 1 c

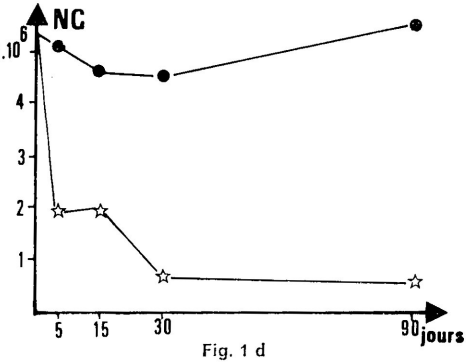


Fig. 1 d

Fig. I. — Effets du mancozèbe sur l'activité biologique globale des sols
— points noirs : sol témoin — étoiles blanches : sol traité
a) **microflore totale.** - b) **algues.** - c) **champignons.** - d) **actinomycètes.** Ordonnées : nombres de germes par gramme de terre sèche. Abscisses : temps en jours
e) **activité deshydrogénasique** ordonnées : microlitres d'hydrogène produits par 100 g de terre en 24 heures d'incubation. Abcisses : temps en jours.

dans le processus respiratoire normal que les deshydrogénases catalysent le transfert d'électrons vers la chaîne des cytochromes.

Il faut constater que les germes résistants (qui constituent la microflore d'après traitement) sont très actifs ; bien que peu nombreux, ils assurent à eux seuls 60 p. 100 de l'activité déshydrogénasique et 90 p. 100 du dégagement de gaz carbonique observés dans les sols témoins n'ayant pas reçu de « mancozèbe ».

Variation de composition de la micropopulation

On retrouve chez les algues et les champignons l'effet dépressif initial (fig. 1 b et 1 c). Mais, dès le 1er mois, la flore algale et la mycoflore ne sont plus « significativement » inhibées. En ce qui concerne les actinomycètes (fig. 1 d) leur nombre ne subit une diminution « nette » qu'à partir du 1er mois. Par contre, il semble que les bactéries soient le groupe microbien le plus affecté par le fongicide. Immédiatement après le traitement leur nombre est fortement réduit, au point qu'au bout de 5 jours, les champignons et les actinomycètes représentent la plus grande partie de la microflore totale. Puis les bactéries les plus résistantes se développent de nouveau lorsque les conditions du milieu redeviennent favorables (dégradation du produit, composés organiques libérés par les cellules mortes) et leur prolifération entraîne des effets antagonistes vis-à-vis des actinomycètes qui régressent continuellement (10 fois moins au 3^{e} mois).

Effets du fongicide sur la minéralisation du carbone

Le nombre des germes participant à la minéralisation du carbone diminue très fortement aussitôt après l'adjonction de « mancozèbe » (de 40 à 2 000 fois suivant les groupements fonctionnels). L'inhibition est peu marquée pour l'amylolyse et la cellulolyse en aérobiose à partir du 1er mois tandis qu'elle demeure hautement « significative » jusqu'au-delà du 3^{e} mois dans le cas de l'hémicellulolyse (20 fois moins). Par contre, les germes effectuant la cellulolyse en anaérobiose tendent à proliférer (4 fois plus au 1er mois).

Cette diversité de réactions au fongicide selon les fonctions étudiées n'est qu'apparente. En effet, lorsqu'on examine la composition de chaque microflore spécifique d'une fonction donnée, il apparaît une certaine unité dans les effets du mancozèbe :

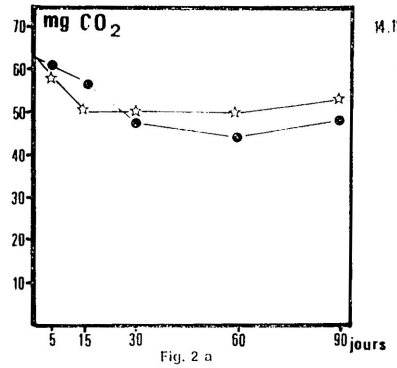


Fig. 2 a

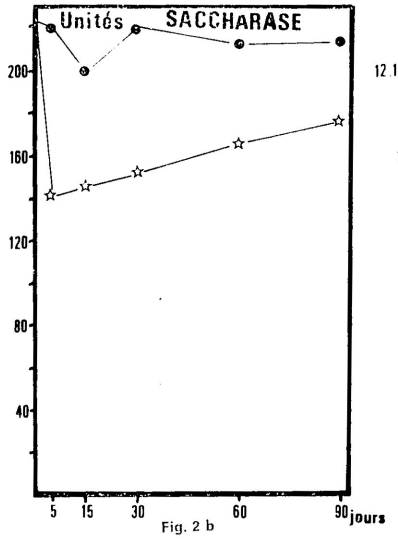


Fig. 2 b

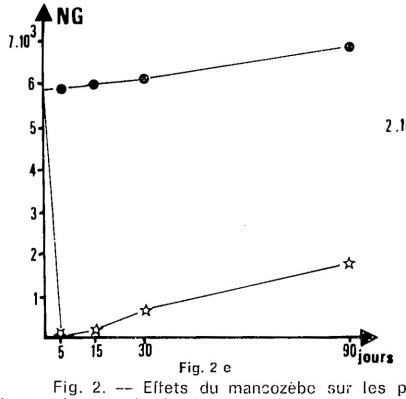


Fig. 2 e

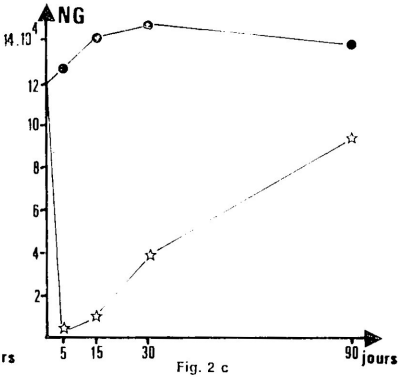


Fig. 2 c

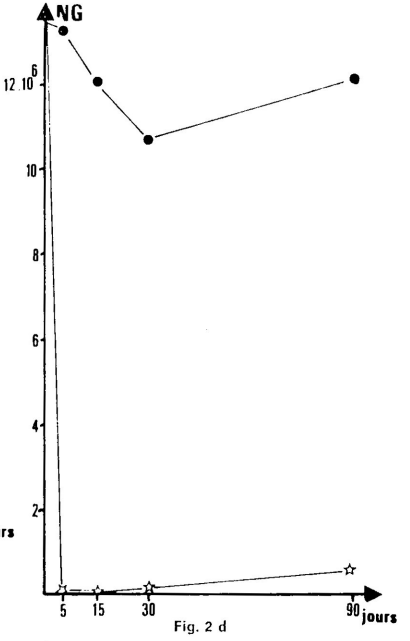


Fig. 2 d

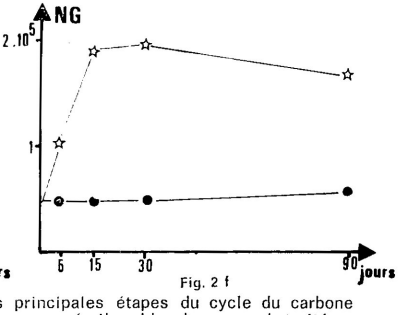


Fig. 2 f

Fig. 2. — Effets du mancozèbe sur les principales étapes du cycle du carbone
— points noirs : sol témoin — étoiles blanches : sol traité
a) Dégagement de gaz carbonique. Ordonnées : mg de CO_2 dégagé en 21 jours par 100 g de terre. Abscisses : temps en jours.
c) Amylolyse. - d) Hemicellulolyse. - e) Cellulolyse en aérobiose. - f) Cellulolyse en anaérobiose. d'incubation. Abscisses : temps en jours.
c) Amylolyse. - d) Hemicellulolyse. - e) Cellulolyse en aérobiose. - f) Cellulolyse en anaérobiose. Ordonnées : nombre de germes par gramme de terre sèche. Abscisses : temps en jours.

— **Amylolyse :** La dégradation de l'amidon comporte des phénomènes d'hydrolyse catalysés par des enzymes spécifiques qui rompent la liaison glucosidique (amylases). Nombreux sont les microorganismes qui produisent des amylases, qu'il s'agisse de bactéries sporulées ou non, aérobies ou anaérobies, de champignons filamenteux ou encore d'actinomycètes. Il est donc normal que la microflore amylolitique ne soit plus « significativement » réduite après un mois, ce qui est dû notamment au développement des bactéries (les Clostridium en particulier, peuvent fermenter l'amidon de façon complète jusqu'au stade acides organiques, et cette dégradation est très active en anaérobiose). On constate sur la figure 2 c qu'en fin d'expérience la densité des germes est redevenue pratiquement normale.

— **Hémicellulolyse :** La densité de la microflore hémicellulolytique reste très faible jusqu'au 3^{e} mois (fig. 2 d) malgré la grande diversité de germes impliqués dans la dégradation des hémicelluloses. Il n'y a pas en effet de microflore nettement spécialisée dans cette fonction. Cette forte inhibition peut s'expliquer cependant par le ralentissement de la décomposition des hémicelluloses en anaérobiose. La fragmentation de ces grosses molécules en unités plus petites et solubles nécessite l'intervention d'enzymes hydrolysantes diffusibles qui sont élaborées par les microorganismes actifs (ce qui implique une nutrition azotée suffisante). De plus les enzymes hémicellulolytiques (en particulier les xylanases) produites par les bactéries anaérobies ont une activité spécifique faible.

— **Cellulolyse :** L'aptitude à dégrader la cellulose se rencontre chez des microorganismes très divers (bactéries, actinomycètes, champignons) mais, dans chacun de ces groupes, elle est limitée à un petit nombre d'espèces. C'est ainsi que dès le 5^{e} jour on assiste, en anaérobiose, à la prolifération des germes cellulolytiques (fig. 2 f). En aérobiose, la participation des champignons est très importante, ce qui permet à cette fonction de redevenir active dès le 1er mois (fig. 2 e).

— **Activité saccharasique :** Elle est très « significativement » réduite durant les 15 jours qui suivent l'incorporation du fongicide, puis elle revient à une valeur voisine de celle obtenue en sol non traité (fig. 2 b) ; cela signifie que cette enzyme n'est pas spécifiquement inhibée par le « mancozèbe » qui ne disparaît complète-

ment qu'au-delà du 3e mois. Par contre, son origine microbienne explique la similitude de réaction au produit avec l'ensemble des germes participant au cycle du carbone.

En conclusion, l'augmentation du dégagement de gaz carbonique à partir du 1er mois permet de supposer que, globalement, la minéralisation du carbone s'effectue normalement grâce surtout à la prolifération des germes en anaérobiose.

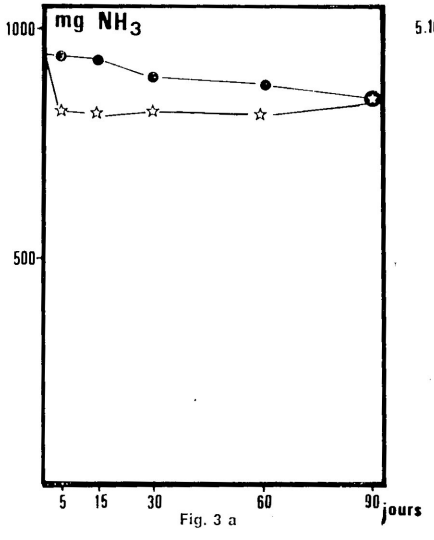


Fig. 3 a

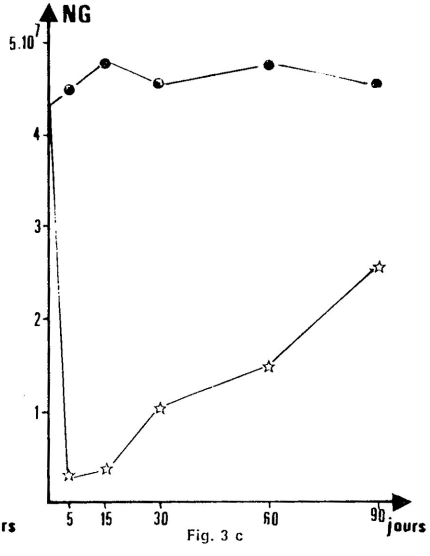


Fig. 3 c

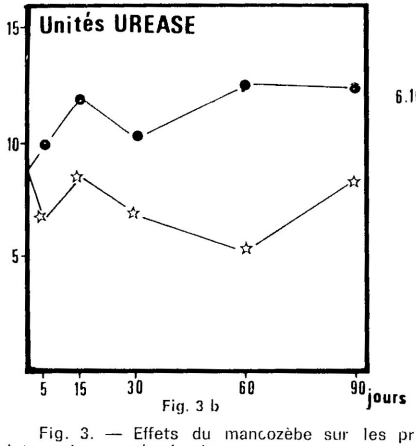


Fig. 3 b

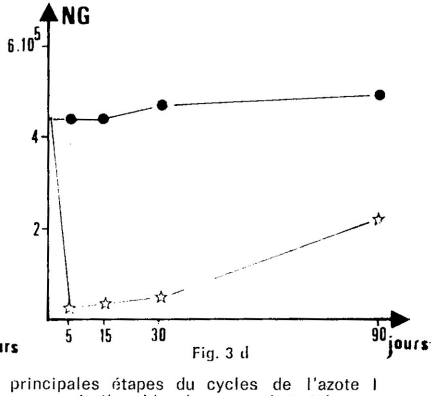


Fig. 3 d

Fig. 3. — Effets du mancozèbe sur les principales étapes du cycles de l'azote I
— points noirs : sol témoin — étoiles blanches : sol traité

a) Activité ammonifiante. Ordonnées : mg de NH_3 dégagé par 100 g de terre en 21 jours. Abscisses : temps en jours.

b) Activité uréasique. Ordonnées : mg d'azote libéré par 100 g de terre en 3 heures d'incubation. Abscisses : temps en jours.

c) Ammonification. - d) Protéolyse. Ordonnées : nombre de germes par gramme de terre sèche. Abscisses : temps en jours.

Effets du fongicide sur le cycle de l'azote

L'étude **in vitro** avait montré que le fongicide provoquait une forte diminution des populations impliquées dans la minéralisation de l'azote (jusqu'à 20.000 fois moins pour la microflore ammonifiante). Bien que moins marqués, les effets exercés sur la microflore **in situ** risquent de déséquilibrer profondément le cycle de l'azote.

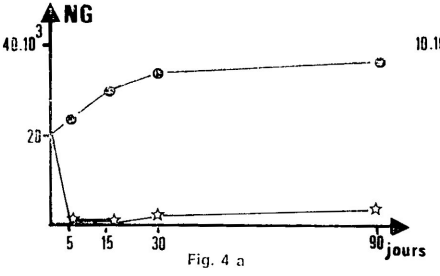


Fig. 4 a

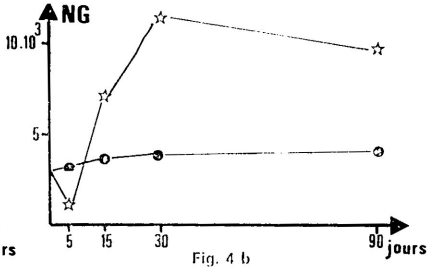


Fig. 4 b

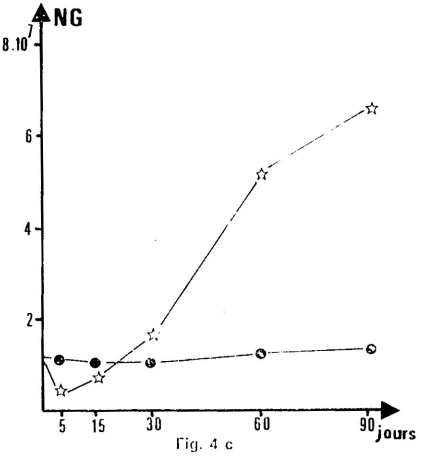


Fig. 4 c

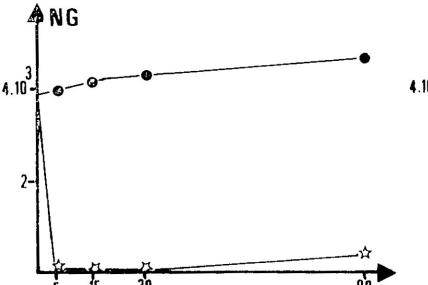


Fig. 4 d

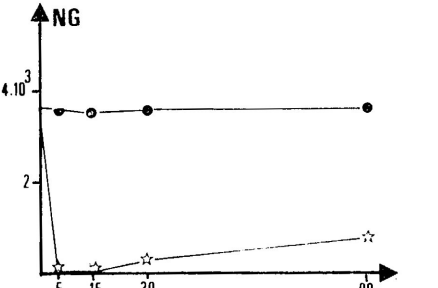


Fig. 4 e

Fig. 4. — Effets du mancozèbe sur les principales étapes du cycle de l'azote II
— points noirs : sol témoin — étoiles blanches : sol traité
a) Fixation libre d'azote en aérobiose - b) Fixation libre d'azote en anaérobiose - c) Dénitrification - d) Nitritation. - e) Nitratation. Ordonnées : nombre de germes par gramme de terre sèche. Abscisses : temps en jours.

— **Fixation libre d'azote :** Lors de la fixation libre d'azote moléculaire, cet élément, chimiquement inerte, est incorporé dans des combinaisons organiques complexes par des processus biochimiques particuliers (nitrogénase) qui nécessitent un important apport d'énergie. HEREMANS et **al.** (1975) n'ont pas décelé d'inhibition de la nitrogénase par les dithiocarbamates (autres que le « mancozèbe ») chez Azotobacter vinelandii. La très forte diminution des Azotobacter (fig. 4 a) est donc la conséquence d'une action spécifique du « mancozèbe », sans doute au niveau des voies respiratoires puisque les Clostridium, qui sont au contraire anaérobies, sont stimulés (fig. 4 b).

Cependant il est vraisemblable que cette fonction s'effectue quasi-normalement dans un sol traité, d'autant plus que les algues (dont certaines fixent l'azote moléculaire) sont peu affectées par le « mancozèbe ».

— **Ammonification :** Les microflores protéolytique et ammonifiante sont « significativement » réduites jusqu'au 1er mois (fig. 3 c et 3 d) et ne retrouvent que plus tardivement une activité normale (on voit sur la figure 3 a que l'activité ammonifiante est « significativement » inhibée pendant 60 jours). Or, la grande variété de germes participant à la dégradation de l'azote organique (il intervient notamment des bactéries anaérobies et des champignons) ne permet pas d'expliquer une action aussi marquée de la part du fongicide. POCHON et TCHAN (1947) ont montré que la libération d'ammoniac à partir des substances protéiques est un processus organisé au cours duquel apparaissent successivement des bactéries, des actinomycètes puis finalement des champignons. La diminution de l'ammonification doit résulter de la disparition de nombreuses bactéries au début du traitement.

L'ultime étape de l'ammonification est le fait de désaminases comme l'uréase par exemple. Or, nous constatons sur la fig. 3 b que cette enzyme est fortement inhibée pendant les trois premiers mois. Vis-à-vis de l'uréase, le « mancozèbe » se comporte donc comme le « ferbam », un autre dithiocarbamate (WEED, 1953).

En conséquence, la teneur en ammonium du sol est réduite de moitié, au bout d'un mois, par le traitement au fongicide.

— **Nitrification :** L'azote ammoniacal est transformé en azote nitrique en deux étapes, qui sont le fait de populations spécifiques. On voit sur la fig. 4 d que les germes nitreux (Nitrosomonas) qui oxydent l'ammoniaque en nitrites, sont « significativement » réduits pendant 3 mois (10 fois moins au 3e mois). La réduction du nombre de germes nitriques (Nitrobacter), responsables de l'oxydation des nitrites en nitrates, cesse d'être « significative » à partir du 1er mois (fig. 4 e) mais reste cependant « nette » jusqu'au 3e mois (5 fois moins). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec le « manèbe » mais à des doses beaucoup plus fortes (SAIVE et **al.**, 1974), le « zinèbe » (WILSON, 1954) et d'autres dithiocarbamates. La présence de manganèse dans la molécule de « mancozèbe » serait un facteur supplémentaire de toxicité (MEIKLEJOHN, 1952).

En définitive, ces effets du fongicide se traduisent par une teneur en nitrates du sol six fois plus faible qu'en sol non traité.

— **Dénitrification :** Après un léger effet dépressif initial on assiste à la prolifération des micro-organismes dénitrificateurs (fig. 4 c) qui n'est pas provoquée par un apport massif de nitrates (puisque la nitrification est réduite) mais par une augmentation du nombre de germes réduisant les nitrates en anaérobiose. En outre, les champignons, mis en évidence sur le milieu de culture, représentent une fraction importante de la microflore dénitrifiante.

En résumé, on peut dire que le «mancozèbe » entraîne un profond déséquilibre du cycle de l'azote pendant au moins trois mois. Mais il faut nuancer cette conclusion en considérant que l'évolution de l'azote d'un sol cultivé dépend aussi d'autres facteurs, en majorité non biologiques.

Les gains d'azote les plus importants sont d'origine non microbienne (fumures minérales et organiques), tandis que les apports d'origine bactérienne, bien que négligeables ne sont pas diminués par le « mancozèbe » (puisque la fixation libre d'azote semble s'effectuer normalement).

La minéralisation de l'azote est fortement perturbée par le fongicide. En effet, le taux de minéralisation (obtenue par la détermination de l'azote minéralisable selon DROUINEAU et LEFEVRE, 1949) est environ 4 fois plus faible qu'en sol non traité. Cela résulte de l'inhibition de l'ammonification (la teneur en ammonium du sol est réduite de moitié un mois après le traitement) et de la nitrification (teneur en nitrates du sol six

fois plus faible au bout d'un mois). Ce ralentissement de la minéralisation pourrait être la cause d'un déficit en nitrates dans les sols où l'on n'apporte pas d'azote sous forme nitrique.

La perte d'azote par le processus de dénitrification, bien qu'augmentée par le « mancozèbe » ne doit pas avoir des conséquences pratiques importantes : dans les sols du vignoble bordelais, ces pertes sont surtout dues à des phénomènes de lessivage.

Action du « mancozèbe » sur le cycle du soufre

Les plantes utilisent le soufre du sol essentiellement sous forme de sulfates qui ont une double origine :

— oxydation du soufre minéral provenant de la roche-mère ;

— minéralisation du soufre organique selon deux processus parallèles ; il existe une voie directe jusqu'au stade sulfate et une autre voie passant par le stade intermédiaire des sulfures.

En outre, les sulfates peuvent être réduits selon un mécanisme inverse conduisant aux sulfures. Cette complexité du cycle du soufre implique l'existence de populations spécifiques. L'étude de trois de ces microflores montre que le « mancozèbe » provoque un profond déséquilibre du cycle du soufre pendant au moins 90 jours.

— **Minéralisation du soufre organique :** Le milieu préconisé par POCHON et TARDIEUX (1962) ne permet de dénombrer que les microorganismes oxydant, en anaérobiose, le soufre organique jusqu'au stade sulfure. La densité de cette population est très faible dans les sols étudiés mais on constate sur la figure 5 c qu'elle augmente fortement un mois après l'addition du fongicide. L'apport de soufre organique contenu dans la molécule de « mancozèbe » est très faible (4 mg par kg de terre pour un traitement de 10 mg par kg) par rapport aux teneurs en soufre des sols (de l'ordre de 100 mg par kg). Cependant, au cours de la dégradation du fongicide, il se forme des dérivés contenant des atomes de soufre, plus accessibles que le soufre organique du sol, que ces germes peuvent utiliser préférentiellement.

— **Oxydation du soufre minéral :** La figure 5 b montre que la microflore sulfo-oxydante est significativement réduite pendant 15 jours,

puis tend progressivement à retrouver une densité normale. Cette faible réaction au fongicide est due à la diversité des microorganismes oxydant le soufre selon des processus métaboliques très variés. Par exemple, certaines bactéries comme Thiobacillus denitrificans peuvent utiliser l'énergie provenant de la réduction des nitrates au cours de la dénitrification.

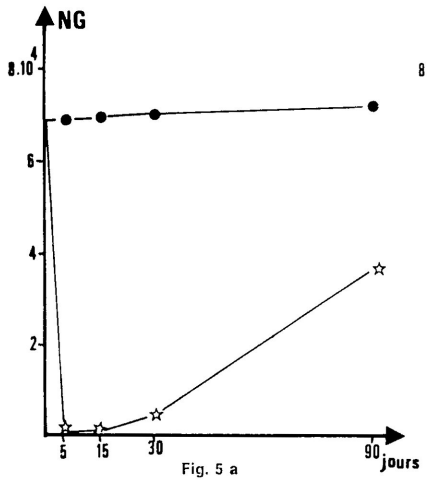


Fig. 5 a

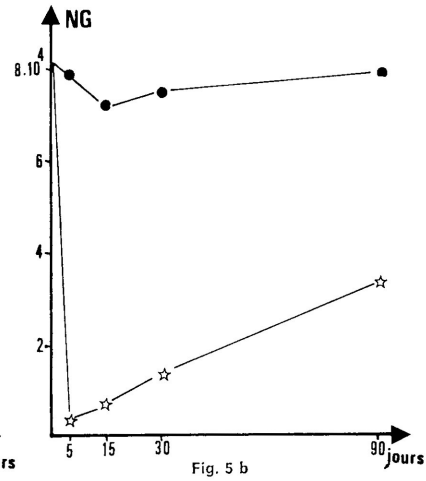


Fig. 5 b

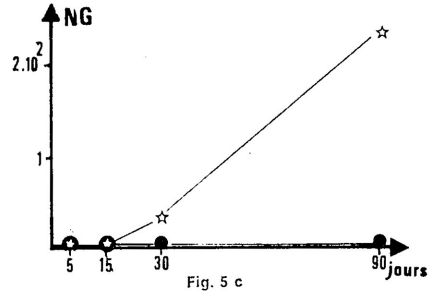


Fig. 5 c

Fig. 5. — Effets du mancozèbe sur les principales étapes du cycle du soufre

a) Réduction des sulfates. - b) Oxydation du soufre minéral. - c) Minéralisation du soufre organique en anaérobiose. Ordonnées : nombre de germes par gramme de terre sèche. Abscisses : temps en jours.

— points noirs : sol témoin — étoiles blanches : sol traité

— **Réduction des sulfates :** Le nombre des bactéries sulfato-réductrices diminue beaucoup après le traitement (700 fois moins) et ne retrouve une densité normale qu'au 3e mois (fig. 5 a). Or, il s'agit uniquement de germes strictement anaérobies. Il est possible que, **dans le milieu de culture employé,** il y ait blocage enzymatique par le « mancozèbe » de l'utilisation de l'acide lactique comme donateur d'électrons.

Mode d'action du fongicide sur la microflore tellurique.

En tant que fongicide, le mancozèbe est destiné à tuer les champignons responsables de certaines maladies cryptogamiques des végétaux. Afin de ne pas perturber l'équilibre naturel, il doit agir sur un processus métabolique spécifique de l'agent pathogène visé. Or, les effets observés montrent qu'il touche un grand nombre de microorganismes du sol par :

— la prédominance de la respiration anaérobie et des fermentations sur la respiration proprement dite.

— L'inhibition de différentes enzymes (Uréase en particulier).

Il semble donc que le mancozèbe interfère avec le mécanisme de production de l'énergie commun à tous les germes aérobies. Ce mode d'action pourrait être comparé à celui du cyanure, ou de l'oxyde de carbone, qui se combinent avec les oxydases cytochromiques terminales des organismes aérobies ; cela semblerait confirmer les résultats obtenus avec d'autres dithiocarbamates : il a été démontré en effet, que le « thiram » et le » ferbam » bloquaient les enzymes à groupe — SH, principalement le coenzyme A (LUDWIG et THORN, 1960 ; DUBOIS et **al.**, 1961). Mais il faut éviter une comparaison prématurée des effets du « mancozèbe » avec les autres fongicides de la famille des dithiocarbamates, car le « mancozèbe » est un produit de coordination à haut poids moléculaire (2715) dont la conformation spatiale est très différente de celle du « manèbe » et du « zinèbe » par exemple, dont le poids moléculaire n'excède pas 300.

Dans la mesure où ce mode d'action éventuel serait vérifié pour le « mancozèbe », le déséquilibre de la microflore tellurique disparaîtrait progressivement au fur et à mesure de la dégradation du produit, les voies du métabolisme aérobie pouvant alors fonctionner de nouveau.

LA DEGRADATION DU MANCOZEBE DANS LES SOLS DE VIGNOBLE

Le retour à un équilibre biologique convenable dépend donc de l'élimination du fongicide. Cette disparition ne doit pas reposer seulement sur les processus physiques tels que le lessivage dont l'effet est de transférer ailleurs (nappes phréatiques, cours d'eau) la pollution mais doit comporter une destruction de la molécule conduisant à des produits inactifs.

Influence de divers facteurs physiques et physicochimiques sur la dégradation.

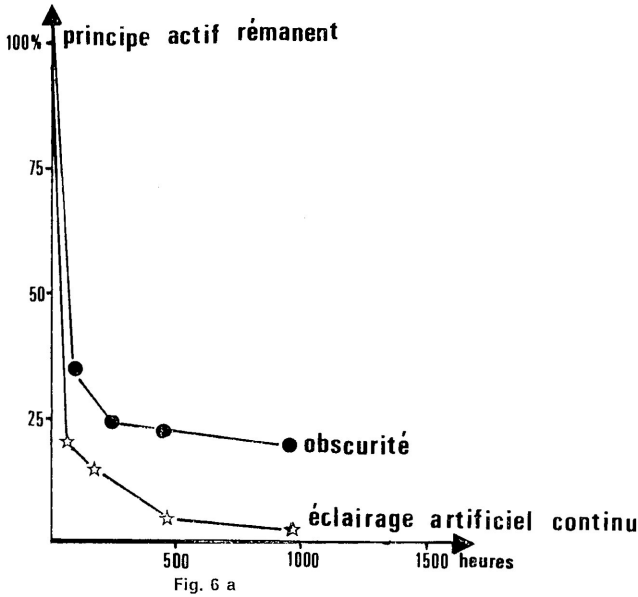


Fig. 6 a

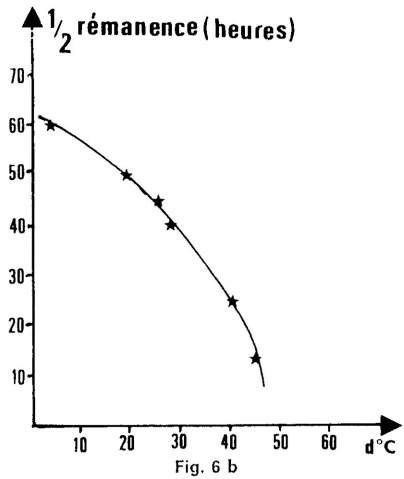


Fig. 6 b

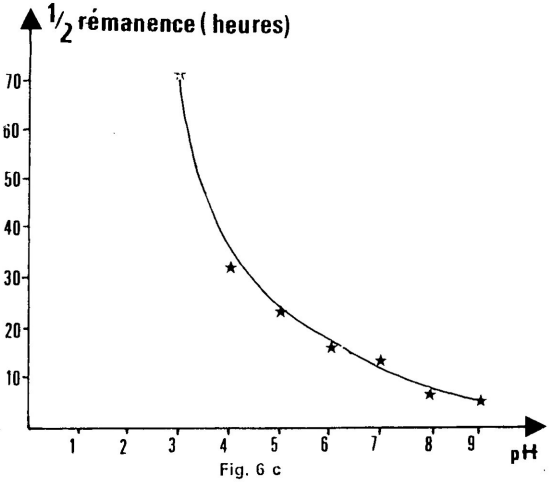


Fig. 6 c

Fig. 6. — Influence de différents facteurs physiques et physicochimiques sur la dégradation du mancozèbe

c) Influence du pH : durée de demi-rémanence en heures. Abscisses : unités de pH.

b) Influence de la température. Ordonnées : durée de demi-rémanence en heures. Abscisses : température en degrés Celsius.

c) Influence du pH. Ordonnées : durée de demi-rémanence en heures. Abscisses : unités de pH.

Comme de nombreux dithiocarbamates, le « mancozèbe » en suspension aqueuse est rapidement dégradé par oxydation. Les radiations lumineuses interviennent dans cette oxydation. On constate sur la figure 6 a que la dégradation est plus rapide en éclairage artificiel continu qu'à l'obscurité. Des essais, d'ailleurs infructueux, de stérilisation du produit par irradiation ultra-violette ont mis en évidence la participation à cette photo-oxydation des radiations de longueur d'onde inférieure à 280 nm.

Nous avons observé, en solution stérile, que l'élévation de la température accélère cette dégradation comme cela avait déjà été montré pour le « manèbe » (VIEL et CHANCOGNE, 1964 ; BONTOYAN et LOOKER, 1973). De 0 °C à 20 °C la durée de demi-rémanence diminue peu, tandis qu'elle est réduite de moitié à 40 °C (fig. 6 b).

L'augmentation de pH entraîne une instabilité plus grande de la molécule (plus forte solubilité en milieu alcalin) et une durée de demi-rémanence très courte au-dessus de pH = 7 (fig. 6 c).

Cette dégradation en solution stérile conduit à une disparition pratiquement totale du produit au bout de 1.000 heures.

Lessivage du « mancozèbe » dans les sols.

La présence plus ou moins prolongée du fongicide dans la couche superficielle du sol peut avoir pour conséquence un lessivage de ce produit et le transfert de la pollution au niveau des eaux souterraines. Des essais d'infiltration ont été réalisés pour déterminer la possibilité de pénétration du fongicide dans le sol.

Pour cela, des tubes de verre, de 25 cm de hauteur et 7 cm^2 de section, sont remplis de terre tamisée à 2 mm et non tassée. Le « mancozèbe » est pulvérisé en surface et l'on dispose sur la section de sol une couche de petites billes de verre afin de mieux répartir l'eau correspondant à la quantité d'eau susceptible de draîner dans les sols de vignoble du Bordelais. La comparaison des données, concernant les précipitations et l'évapotranspiration de la vigne au cours d'une année, nous a permis de fixer ce volume à 350 cm^3 (en fonction de la section de 7 cm^2). Pour les six sols choisis, la totalité de l'eau a percolé en moins de 48 heures. Les résidus de fongicide ont été dosés selon la méthode de KEPPEL (1971), par tranches de 5 cm de sol et dans l'eau de percolation.

Les résultats obtenus font apparaître des différences dans les six sols étudiés mais, en moyenne (fig. 7), 90 % au moins de la substance

active est retenue dans les vingt premiers centimètres et la teneur dans l'éluat demeure toujours inférieure à 10 %. Il est donc peu probable que le fongicide puisse rejoindre la nappe phréatique car, peu soluble, il est fixé dans les premières couches du sol qui se comportent comme un filtre. Par contre, les microorganismes qui ne sont abondants que dans les premiers centimètres du sol vont rester en contact avec le « mancozèbe » ainsi retenu.

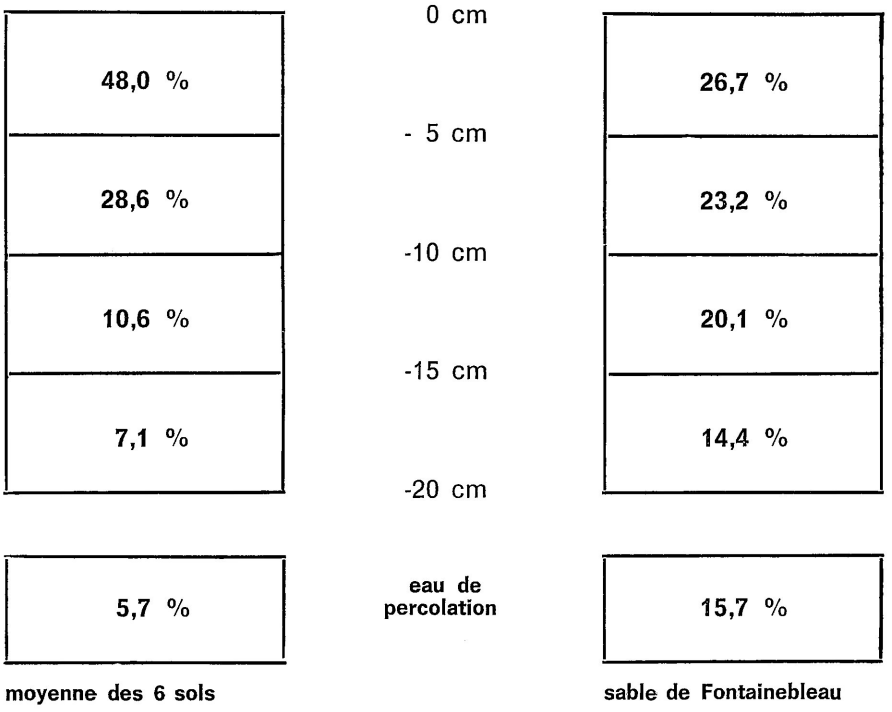


Fig. 7. — Rétention du « mancozèbe » dans les couches superficielles des sols (% de substance active en fin d'expérience).

La dégradation du « mancozèbe » dans les sols de vignoble.

Dans une première étude (DONECHE et SEGUIN, 1975), le traitement au « mancozèbe » a été réalisé par pulvérisation d'une suspension stérile de produit à des doses suffisamment élevées (60 mg par kg) pour faciliter la détection des résidus de substances actives. Chaque échantillon de sol avait été placé dans des boîtes de Pétri et réparti en trois lots dont deux avaient été stérilisés selon des techniques différentes :

— par la chaleur (5 jours à l'étuve à 120 °C) qui détruit les enzymes libres et la microflore ;

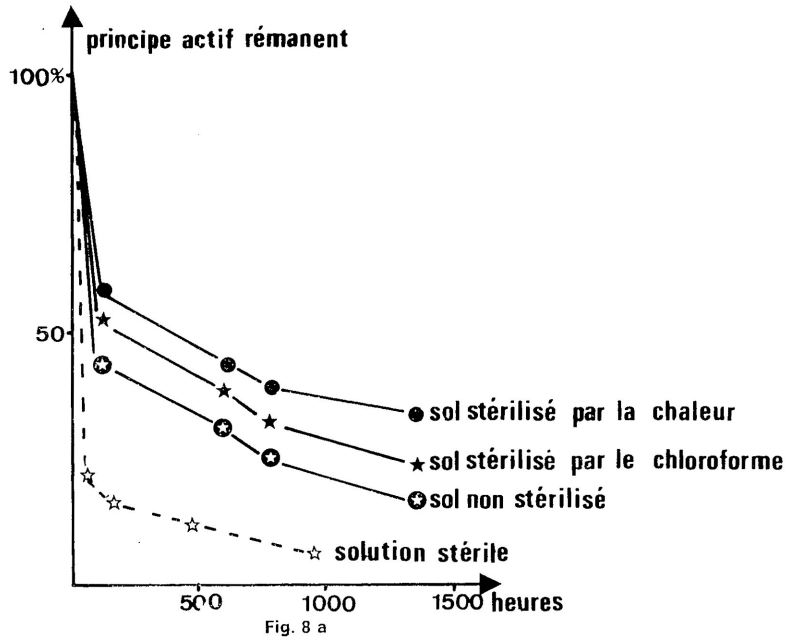


Fig. 8 a

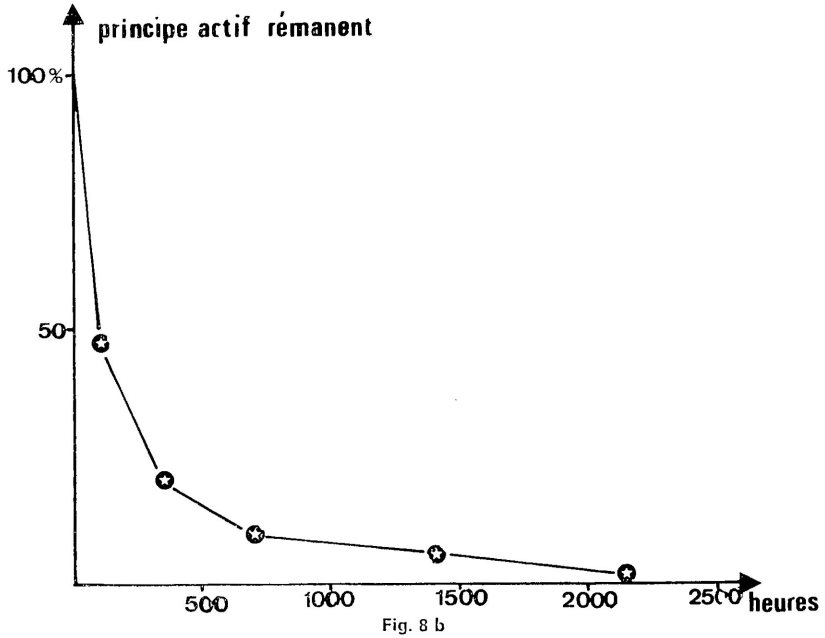


Fig. 8 b

Fig. 8. — Dégradation du mancozèbe dans les sols de vignoble.

a) Etude expérimentale des différents facteurs intervenant dans la dégradation. - b) Dégradation dans les sols du vignoble bordelais. Ordonnées : % de principe actif rémanent. Abscisses : temps en heures.

— par addition de chloroforme qui inhibe les microorganismes, mais permet d'étudier l'action des enzymes libres du sol (DURAND, 1966).

La teneur en eau a été amenée aux 2/3 de la capacité de rétention. La figure 8 a montre l'allure générale de la dégradation selon les conditions de l'expérience.

Pour l'ensemble des sols étudiés, on constate dans un premier temps (de 0 à 120 h) une disparition très rapide du fongicide qui correspond à la conjonction de plusieurs facteurs : destruction du mancozèbe par oxydation et dégradation biologique qui, dans cette première phase, est déjà importante (en moyenne 23 p. 100 de la dégradation totale). Le ralentissement que l'on observe par la suite semble lié à la stabilisation du produit (effet protecteur des divers colloïdes du sol). L'efficacité des processus non biologiques est alors plus limitée tandis que la biodégradation devient prépondérante.

— **Stabilisation du mancozèbe dans le sol :** En sol stérilisé par la chaleur, la durée de demi-rémanence est environ huit fois plus grande qu'en solution stérile. Cette stabilisation s'accentue au cours du temps (la durée de quart de rémanence est 34 fois plus grande).

Après 1 500 heures, il reste de 25 à 48 p. 100 de substances actives dans les échantillons stérilisés par la chaleur. Cela confirme l'effet protecteur du sol, variable suivant sa nature, mais sans qu'il soit possible de faire ressortir l'influence prépondérante de tel ou tel facteur.

— **Dégradation biologique :** Elle est représentée par la surface comprise entre les courbes de dégradation du sol stérilisé par la chaleur et du sol non stérilisé (fig. 8 a). Dès le départ la dégradation biologique (microorganismes et enzymes libres) est importante et augmente progressivement jusqu'au 2e mois. L'accroissement de la biodégradation semble provenir d'une part de l'adaptation de la microflore ou de certains germes à la destruction de la molécule, d'autre part du fait qu'au cours de la dégradation il apparaît des dérivés de plus en plus labiles et assimilables.

— **Participation des microorganismes à la dégradation du « mancozèbe »** : Elle est représentée sur la fig. 8 a par la surface comprise entre les courbes de dégradation du sol stérilisé par le chloroforme et du sol non stérilisé. Si l'on exprime (fig. 9) la quantité de produit dégradé par rapport à la quantité de produit à l'instant t (ramenée à 100 microgrammes de manière à obtenir

un pourcentage), on constate que la participation des microorganismes représente la plus grande partie de la biodégradation totale au départ (environ les 2/3 au 5e jour) mais n'augmente que faiblement, si bien qu'au 60e jour elle ne représente plus qu'un peu moins de la moitié de la biodégradation totale.

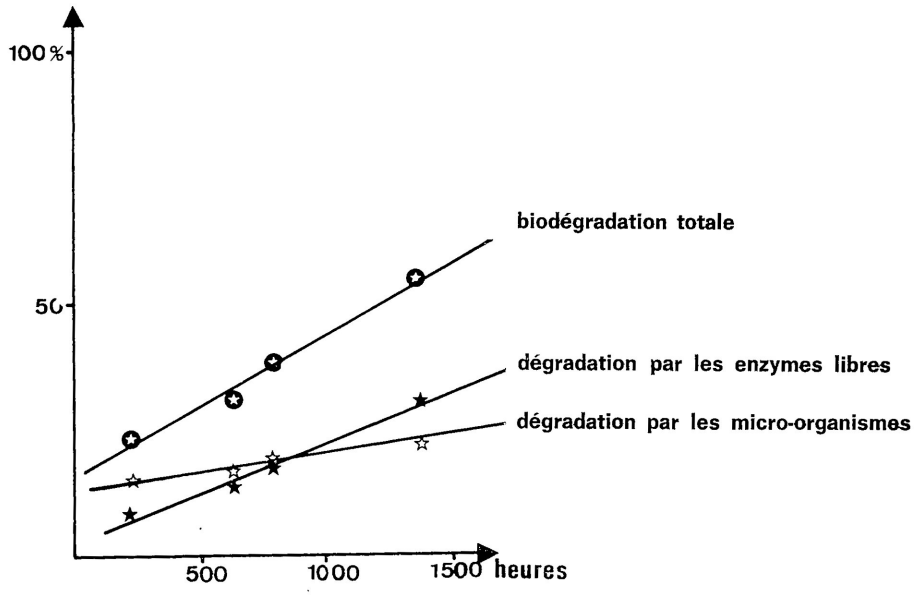


Fig. 9. — Evolution de la biodégradation en fonction du temps.
Ordonnées : microgrammes de « mancozèbe » dégradé par les microorganismes, les enzymes libres, ou les deux, par rapport à 100 microgrammes de produit restant. Abscisses : temps en heures.

— **Action des enzymes libres du sol :** Le chloroforme inhibe les microorganismes mais n'affecte pas l'activité des enzymes libres du sol (DURAND, 1966). Ces enzymes sont actives dans la dégradation (surface comprise entre les courbes de dégradation du sol stérilisé par la chaleur et du sol stérilisé par le chloroforme sur la fig. 8 a). La participation des enzymes libres à l'élimination du fongicide augmente au cours de l'expérience : sur la fig. 9 on constate qu'elle passe de 1/3 (au 5e jour) à un peu plus de la moitié (au 60e jour) de la biodégradation totale.

Ceci est dû, vraisemblablement, au développement progressif des bactéries au fur et à mesure de la disparition du chloroforme. En effet, l'addition de l'antiseptique n'a été faite qu'une fois, au temps O, et il a pu disparaître progressivement par volatilisation.

Il est cependant logique de penser, qu'après stabilisation du « mancozèbe » par les colloïdes du sol, les enzymes, qui sont capables de diffuser, entrent plus facilement que les microorganismes en contact avec les molécules du fongicide.

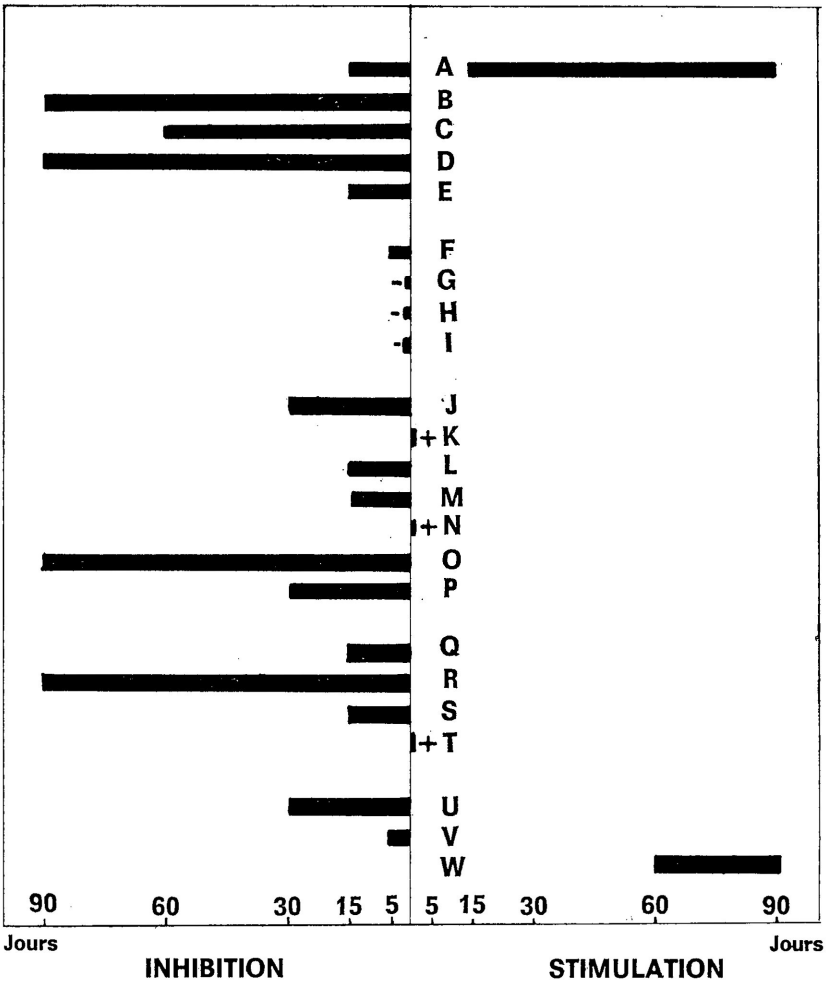


Fig. 10. — Durée des effets « significatifs » du mancozèbe.

A — Dégagement de gaz carbonique
B — Activité déshydrogénasique
C — Activité ammonifiante
D — Activité uréasique
E — Activité saccharasique
F — Microflore totale
G — Champignons
H — Actinomycètes
I — Algues
J — Fixation libre d'azote en aérobiose
K — Fixation libre d'azote en anaérobiose
L — Protéolyse
M — Ammonification
N — Dénitrification
O — Nitritation
P — Nitratation
Q — Amylolyse
R — Hemicellulolyse
S — Cellulolyse en aérobiose
T — Cellulolyse en anaérobiose
U — Réduction des sulfates
V — Oxydation du soufre minéral
W — Minéralisation du soufre organique en anaérobiose

— Parallèlement à l'étude des effets du mancozèbe sur la microflore tellurique, nous avons suivi sa dégradation dans les cuves d'incubation. Le traitement a été réalisé par incorporation du fongicide au sol, à la dose de 10 mg par kg.

L'allure générale de la courbe de dégradation reste la même (fig. 8 b) en particulier la première phase très rapide (même durée de demi-rémanence). Bien que ralentie, la dégradation se poursuit plus rapidement que dans le cas précédent (durée de quart de rémanence 3 fois plus courte). La répartition du « mancozèbe » dans la masse de terre le rend plus accessible aux microorganismes et entraîne son élimination complète après 2.000 heures environ (90 jours).

La rémanence du mancozèbe dépend donc de nombreux facteurs :

— Des paramètres physiques de l'environnement (lumière, température, pH) qui interviennent sur l'oxydation de la molécule.

— Des caractéristiques du sol qui modifient la rétention et la stabilisation du produit.

— De l'activité biologique globale (microorganismes, enzymes libres).

La durée de rémanence est aussi fonction des doses et du mode d'incorporation.

CONCLUSION

Le « mancozèbe » provoque un déséquilibre certain de la microflore tellurique, en favorisant le développement des germes en anaérobiose et en bloquant différents processus métaboliques par inhibition enzymatique. La minéralisation de l'azote paraît être la fonction la plus perturbée (ammonification et nitrification). Or, l'époque des traitements coïncide avec la période de croissance de la vigne et l'accumulation momentanée du fongicide, par suite de traitements trop rapprochés, pourrait être la cause d'une mauvaise nutrition azotée de la vigne.

La dégradation biologique du mancozèbe, venant s'ajouter à une destruction de la molécule par oxydation, conduit à l'élimination presque totale du produit au bout de 3 mois. Nous avons d'ailleurs vérifié que les échantillons de sol prélevés dans le vignoble plus de 4 mois après les

traitements, ne renferment pas de résidus décelables. Il est donc vraisemblable que l'activité biologique est peu modifiée à long terme mais nous avons cependant noté dans les sols du vignoble bordelais une prédominance des germes travaillant en anaérobiose, ce qui est difficilement explicable par la constitution physique de ces sols.

Manuscrit reçu le 22 décembre 1975.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BONTOYAN W.R. et LOOKER J.B., 1973. Degradation of commercial ethylenebisdithiocarbamate formulations to ethylenethiourea under elevated temperature and humidity, **J. Agr. Food. Chem.,** Vol. 21, n° 3, p. 338-341.

DONECHE B., 1974. Effets du « mancozèbe » sur la microflore des sols du vignoble bordelais. Premiers résultats, **C.R. Acad. Sc. Paris,** t. 278 (5 juin 1974), Série D, p. 3011-3014.

DONECHE B. et SEGUIN G., 1975. La dégradation du « mancozèbe » (produit de coordination de l'ion zinc avec l'éthylène-bis-dithiocarbamate de manganèse) dans les sols de vignobles, **C.R. Acad. Sc. Paris,** t. 280 (21 mai 1975), Série D, p. 2265-2268.

DROUINEAU G. et LEFEVRE G., 1949. Première contribution à l'étude de l'azote minéralisable dans les sols. **Ann. Agron..** p. 518-536.

DUBOIS et **al.,** 1961. Inhibitory actions of dithiocarbamates in enzymes of animal tissues. **Toxic. Applied pharmacol., 3,** p. 236.

DURAND G., 1966. **Contribution à l'étude de la biologie du sol : sur le catabolisme des acides nucléiques et de leurs dérivés.** Thèse Fac. Sc., Toulouse.

HEREMANS et **al.,** 1975. Influence of pesticides on the presence and activity of Nitrogenase in Azotobacter vinelandii, **J. Agric. Food chem,.** Vol. 23, n° 3, p. 404-406.

HOFFMANN Gg. PALLAUF J., 1965. Eine kolorimetrische methode zur bestimmung der saccharase-aktivität von böden, **Zeitschrift f. Pflanzenern. Düngung. Bodenk., 110,** Heft 3, p. 193-201.

HOFFMANN Gg. et TEICHER K., 1961. Ein kolorimetrisches Verfahren zur bestimmung der ureaseaktivität in böden, **Zeitschrift f. Pflanzenern. Dungung. Bodenk., 95**, Heft 1, p. 55-63.

ISERMEYER H., 1952. Eine einfache methode zur bestimmung der bodenatmung und der karbonate im böden, **Zeitschrift f. Pflanzenern. Dungung. Bodenk., 56,** p. 26.

KEPPEL E.G., 1971. Collaborative study of the determination of Dithiocarbamate residues by a modified. Carbondisulfide evolution method. **J. of the A.O.A.C.,** Vol. 54, n° 3, p. 528-532.

KREUTZER W.A., 1965. In **Ecology of soil-borne plant pathogens** (Baker, Snyder, éd.). Univ. California Press, p. 495-508.

LUDWIG R.A. et THORN G.D., 1960. Chemistry and mode of action of dithiocarbamate fungicides. **Adv. Pest control research, 3,** p. 219.

MEIKLEJOHN J., 1952. **Nature, 170,** p. 1131.

POCHON J. et TARDIEUX, 1962. **Techniques d'analyse en microbiologie du sol,** 188 p., Ed. de la Tourelle, Saint-Mandé.

POCHON J. et TCHAN Y.T., 1947. **Ann. Inst. Pasteur, 73,** 697.

SAIVE et **al.,** 1975. Influence de quatre fongicides commerciaux sur la microflore tellurique. **Rev. Ecol. Biol. Sol, t. 12,** n° 3, p. 557-566.

SCHAEFER R. , 1963. L'activité deshydrogénasique comme mesure de l'activité biologique globale des sols, **Ann. Inst. Pasteur, 105,** p. 326-331.

VIEL G. et CHANCOGNE M., 1964. Contribution à l'étude de la décomposition des suspensions de manèbe. Action de l'eau, **Phytiatrie-Phytopharm., 13**, p. 171.

WEED et **al.,** 1953. Factors associated with the fungotoxicity of ferbam and nabam. **Contrib-Boyce Thompson Inst, 17,** p. 299.

WILSON H.A., 1954. The effect of certain pesticides on nitrification in soil **W. Virginia Univ. Agr. Exp. Sta. bull., 366** T.