

## Biodégradation anaérobie des structures squelettiques en milieu marin : II approche chimique.

Alain Simon<sup>(1)</sup>, Mathieu Poulicek<sup>(1)</sup>, René Machiroux<sup>(2)</sup> et Jacques Thorez<sup>(3)</sup>

(1) Laboratoire de Morphologie, Systématique et Écologie animales. Université de Liège.

Institut de Zoologie, Quai Van Beneden 22, B-4020 Liège, Belgique.

(2) Laboratoire de Chimie Analytique. Université de Liège. Institut de Chimie.

Bât. B6, Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.

(3) Géologie des Argiles. Université de Liège. Bât. B18,

Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique

**Abstract :** Our experimental approach of anaerobic biodegradation processes was undertaken in the Calvi Bay (Corsica) and lively in aquarium. Three types of calcified skeletons were considered: isolated prismatic layer of *Pinna nobilis* (bivalvia) shell, nacreous layer of *Nautilus pompilius* (cephalopod) shell and stereom of *Sphaerechinus granularis* (echinoid) skeletal plates. The experimental material was embedded into organoclastic sand-filled closed jars retrieved periodically (1,3,6 or 9 months).

I.C.P. and X-ray diffraction analysis, protein, chitin and enzymatic activity estimation showed that calcified skeleton biodegradation occurred very fast in anaerobiosis. Anoxic weathering was almost as fast as the aerobic one. Biodegradation patterns were very different from one type of calcified skeleton to another, caused by differences of organic matter distribution.

In opposition to "classical" views, we showed that anoxic biodegradation processes occur in very similar ways as oxic ones. This means that anoxic decomposition processes may be of utmost importance in recycling organic compounds through nutrients regeneration. In association with biodegradation processes at the water-sediment interface, anoxic biodegradation is a key phenomenon for the understanding of biogeochemical cycles and, further on, explain to a large extent the fate of organic matter in sediments.

**Résumé :** Notre approche expérimentale des phénomènes de biodégradation anaérobie s'est déroulée à Calvi (Corse) et en aquarium. Des échantillons de structures squelettiques calcifiées (Prismes de *Pinna nobilis*, nacre de *Nautilus pompilius* et plaques du test de *Sphaerechinus granularis*) ont été placés dans des récipients en plastique de 2 litres remplis de sable organoclastique puis rebouchés hermétiquement.

L'examen des échantillons par spectrométrie à plasma, et diffraction des rayons X, les dosages de protéines et de chitine ainsi que la mise en évidence des activités enzymatiques ont révélé que la biodégradation des formations squelettiques calcifiées se produit aussi rapidement en anaérobiose qu'en aérobiose et sous l'action des mêmes types d'hydrolases. Les trois structures squelettiques calcifiées envisagées se dégradent différemment, en fonction de la disposition de la matière organique au sein du minéral.

Contrairement aux conceptions largement admises, nous démontrons que la biodégradation anaérobie se déroule selon les mêmes modalités que la biodégradation aérobie. Ces phénomènes permettent un recyclage des composés détritiques, par diffusion des nutriments. Leur étude permet de mieux définir les cycles biogéochimiques et le devenir de la matière organique dans les sédiments.

### INTRODUCTION

Les phénomènes de biodégradation jouent un rôle capital dans les écosystèmes. Sans recyclage efficace et rapide des matériaux constitutifs de la matière vivante, il s'ensuivrait

---

\* Boursier de l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique, dans l'Industrie et l'Agriculture

une accumulation de déchets et un appauvrissement du stock d'éléments biogènes directement accessibles. En milieu marin, la biodégradation des formations squelettiques calcifiées, due aux fungi, cyanophycées, chlorophycées, rhodophycées, diatomées, bactéries et à la méiofaune a été étudiée depuis plusieurs années, mais essentiellement à l'interface eau-sédiment (Hargrave, 1972 ; May & Perkins, 1979 ; Poulicek *et al.*, 1981 ; Poulicek, 1982 ; Poulicek & Jeuniaux, 1982 ; Poulicek, 1983 ; Poulicek & Jaspar-Versali, 1984 ; Poulicek *et al.*, 1988). Par contre, les processus intervenant dans la zone d'anaérobiose semblent avoir suscité moins d'intérêt, du moins sous l'angle expérimental. Or les sédiments anoxiques se retrouvent sous les zones les plus productives des océans (Henrichs & Reeburgh, 1987) et représentent la totalité des strates sédimentaires, à l'exception des quelques premiers centimètres superficiels, proches de la surface du sédiment.

Plusieurs auteurs (Raup & Stanley, 1978 ; Glenn & Arthur, 1988 ; Stein *et al.*, 1986) estiment que les organismes vivant dans le sédiment anoxique sont peu actifs du point de vue de la biodégradation. Ceci devrait donc entraîner la préservation des matériaux organiques et donc provoquer leur accumulation dans les sédiments anaérobiques. Telle est la conception la plus répandue de la biodégradation en milieu anoxique.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Notre approche des processus de dégradation anaérobique se veut expérimentale : nous soumettons des fragments de structures squelettiques calcifiées à l'action des décomposeurs anaérobies. Trois types de structures squelettiques ont été choisies, qui se rencontrent abondamment dans les sédiments organoclastiques :

- Prismes de *Pinna nobilis* (Mollusque bivalve), calcitiques, contenant 1,4 à 1,7% de matière organique chitinoprotéique,
- Nacre de *Nautilus pompilius* (Mollusque céphalopode), aragonitique, contenant 3,2 à 3,8 % de matière organique chitinoprotéique,
- Plaques du test de *Sphaerechinus granularis* (Echinoderme échinoïde), constituées de calcite magnésienne (10 à 12 % de  $MgCO_3$ ) et de 1,6 à 2,8 % de matière organique glycoprotéique non chitineuse.

Rappelons que la solubilité de la calcite magnésienne est plus élevée que celle de l'aragonite, elle-même plus soluble que la calcite (Chave *et al.*, 1962).

Ces matériaux furent fragmentés et calibrés avant d'être placés dans des sacs en voile de nylon à mailles 50  $\mu m$ , 180  $\mu m$  ou 400  $\mu m$ . Ces sacs ont été placés dans des récipients en plastique de 2 litres, fermés hermétiquement après avoir été remplis à ras bord de sédiment provenant des sites expérimentaux.

Certains échantillons ont été soumis à l'action des décomposeurs aérobies pendant 1, 3 ou 6 mois à l'interface eau-sédiment avant d'être enfermés dans les jarres expérimentales. Cette deuxième série d'expériences avait pour but de reproduire au mieux les conditions de dégradation intervenant avant l'enfouissement dans la zone anoxique du sédiment. Nous

avons travaillé d'une part sur une tache de sable organoclastique intermatte située à 37 mètres de fond dans l'herbier à posidonies de la baie de Calvi et d'autre part, sur du sable coquillier (constitué uniquement de coquilles de mollusques bivalves recueillies sur la côte belge) des filtres bactériens de l'Aquarium public de l'Université de Liège.

TABLEAU I

Protocole expérimental

	Durée du séjour à l'interface eau-sédim.	Durée du séjour en jarre close	Notation
Calvi	0	1 mois (30 jours)	0+1
	0	3 mois (94 jours)	0+3
	0	6 mois (178 jours)	0+6
	0	9 mois (271 jours)	0+9
	3 mois (94 jours)	3 mois (84 jours)	3+3
	3 mois (94 jours)	6 mois (177 jours)	3+6
	6 mois (178 jours)	3 mois (93 jours)	6+3
Aquarium	0	15 jours	0+0,5
	0	1 mois (30 jours)	0+1
	0	3 mois (92 jours)	0+3
	0	6 mois (183 jours)	0+6
	0	9 mois (274 jours)	0+9
	1 mois (30 jours)	1 mois (32 jours)	1+1
	1 mois (30 jours)	3 mois (92 jours)	1+3
	1 mois (30 jours)	6 mois (182 jours)	1+6
	3 mois (92 jours)	3 mois (91 jours)	3+3
	3 mois (92 jours)	6 mois (182 jours)	3+6
	6 mois (183 jours)	3 mois (91 jours)	6+3

La mesure de la concentration en oxygène dissous (oxymètre à électrode de Clark portative WTW Oxi-digi 88) a permis de vérifier la rapide mise en place des conditions anoxiques dans les récipients clos. Après deux jours, la concentration en oxygène était inférieure à 6,00 % de saturation (Fig. 1).

A l'ouverture des récipients, après 1, 3, 6 ou 9 mois d'expérience, les échantillons exhumés sont soit conservés dans l'alcool 70° jusqu'au moment de l'analyse, soit utilisés immédiatement pour l'évaluation des activités enzymatiques.

#### a) dosage du Fe, Mn et S par spectrométrie à plasma

Mise en solution des échantillons par 0,5 ml de peroxyde d'hydrogène (100 volumes pour analyse) puis 5 ml d'acide nitrique Suprapur Merck concentré. Chauffage (à 70-80 °C) puis ajout de 2 ml d'acide chlorhydrique concentré Suprapur Merck et évaporation à sec. Reprise par 5 ml d'acide nitrique concentré Suprapur Merck et ajustage à 100 ml à l'eau Milli-Q.

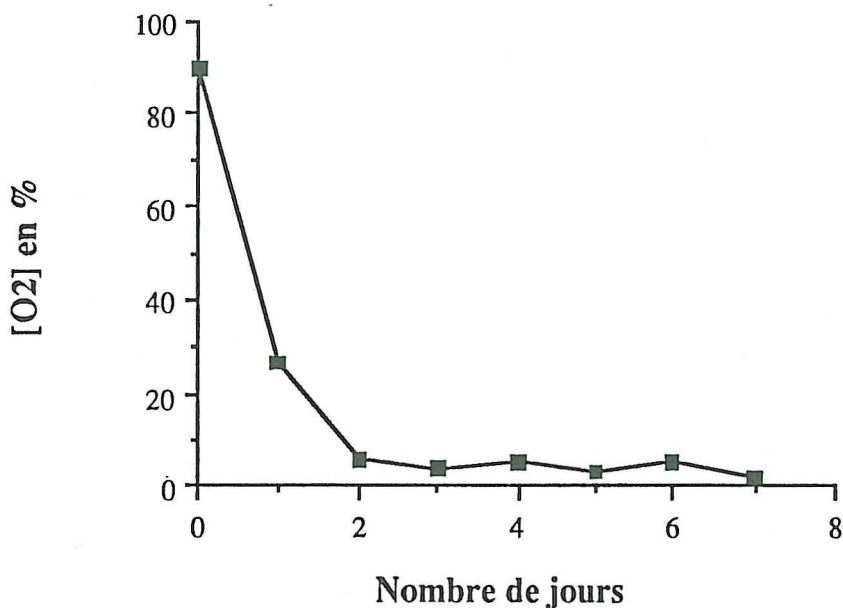


Fig. 1 : Mesure de la concentration en oxygène dissous dans les jarres immergées à Calvi (en % de saturation).

Mesures spectrométriques : effectuées au spectromètre ICP ARL 3510.

Raies utilisées : Fe : 259,94 ; Mn : 257,61 ; S : 180,73

Étalons : solutions nitriques à 5,0 % contenant 0,5 g de  $\text{CaCO}_3$  Suprapur Merck dans 100 ml.

Concentrations : Fe : 4,09 ppm ; Mn : 1,00 ppm ; S : 11,37 ppm

Blanc : solution nitrique à 5,0 % contenant 0,5 g de  $\text{CaCO}_3$  Suprapur

#### b) analyse minéralogique

Elle a été réalisée par diffraction des rayons X sur poudre finement broyée (au mortier d'agate) et désorientée.

#### c) variation de poids

Pesées, avant et après immersion, après dessiccation sous vide en présence de KOH à la balance Sartorius 2001 MP2 ( $d = 0,1$  mg, reproductibilité = 0,5 mg)

#### d) dosage de chitine et de protéines

Les échantillons, décalcifiés par HCl 1 N subissent un traitement par NaOH 1 N à  $100^\circ\text{C}$ , afin de rompre les complexes chitinoprotéiques et rendre ainsi la chitine accessible à l'hydrolyse enzymatique. La quantité de chitine est dosée par la méthode enzymatique de Jeuniaux (1963, 1965) : chitinase purifiée (réf. C 1650, Sigma Chemical Co) à 2 mg/ml pendant 10 heures à pH 5,2 et  $37,0^\circ\text{C}$ . La quantité de N-acétyl-glucosamine libérée est déterminée par colorimétrie [méthode de Reissig *et al.* (1955)].

Les protéines acidosolubles, isolées à partir de la solution de décalcification par dialyse pendant 24 heures vers l'eau distillée, ainsi que les protéines non acidosolubles (scléropro-



téines) du culot de décalcification ont été dosées par la méthode de Schacterle et Pollack (1973) après hydrolyse alcaline (NaOH 1N, 100°C, 4H).

**e) mise en évidence des activités enzymatiques**

Elle est effectuée au moyen de kits Api-Zym (Biomérieux) sur quatre types d'inoculats :

- eau libre interstitielle des jarres expérimentales (obtenue en égouttant le sédiment pour recueillir l'eau de percolation).
- eau liée interstitielle des jarres expérimentales (récoltée par extraction du sédiment égoutté dans un mortier en présence d'eau distillée).
- échantillons provenant des jarres expérimentales (nacre et test de *Sphaerechinus*), broyés dans un mortier en présence d'eau distillée.

Les broyats sont surgelés puis centrifugés, le liquide surnageant servant aux inoculations.

## RÉSULTATS

**a) analyse des échantillons par spectrométrie à plasma**

Ce type d'analyse n'a été réalisé que pour les échantillons immergés à Calvi.

TABLEAU II

Échantillons immergés à Calvi : dosage de fer, manganèse et soufre (en ppm).

	Fe (en ppm)*	Mn (en ppm)*	S (en ppm)*
Prismes témoin	19,2	1,66	5697
Prismes 0+1	12,6	1,65	5679
Prismes 0+3	25,7	1,87	5895
Prismes 0+6	5,4	1,66	6025
Prismes 0+9	22,3	1,77	5725
Nacre témoin	8,8	6,67	3380
Nacre 0+1	33,1	25,6	3440
Nacre 0+3	12,2	32,2	3571
Nacre 0+6	15,7	30,1	3445
Nacre 0+9	9,5	29,6	3464
Limite de détection **	0,75	0,08	34

\* ppm : mg/kg d'échantillon

\*\* pour un échantillon de 0,5 g.

Les teneurs en soufre sont très élevées pour tous les échantillons (y compris les témoins, non immergés) : plus de 3 000 ppm pour la nacre et plus de 5 500 ppm pour les prismes (Tabl. II). Les prismes contiennent 1,5 fois plus de soufre que la nacre ; dans les deux substrats testés les teneurs en soufre restent cependant sensiblement constantes au cours des premières phases de la diagenèse anaérobie.

La nacre contient de 4 à 12 fois plus de Mn que les prismes. On constate également une certaine tendance à l'augmentation de la teneur en Mn au cours de l'expérience (avec un maximum pour 3 mois d'anaérobiose). Dans le cas des prismes de *Pinna*, la teneur en Mn reste sensiblement constante.

Le fer est plus abondant dans la nacre que dans les prismes. Il faut remarquer une nette augmentation de la teneur en fer (d'un facteur 4) dans la nacre après un mois d'anaérobiose. La teneur en fer diminue par la suite, pour se stabiliser dans la nacre immergée 9 mois à des valeurs comparables à celles de départ. La fluctuation des teneurs en fer des prismes de *Pinna* masque les éventuelles tendances liées à la dégradation anaérobie.

### b) analyse de diffraction aux rayons X

Les diffractogrammes ne révèlent que l'aragonite dans la nacre, la calcite chez *Pinna* et *Sphaerechinus*. Les éléments Fe, Mn, S dosés dans le tableau 2 sont présents en trop faible quantité (< 5 %), leur détection n'étant pas possible par cette méthode.

### c) variation de poids des échantillons

Dans les figures 2, 3 et 4 les points indiquent la moyenne des 3 échantillons. Les barres verticales représentent la dispersion des mesures.

Ces figures montrent tous une nette tendance à la perte de poids des échantillons au cours du temps. D'une part cette diminution est plus importante à Calvi qu'en aquarium et

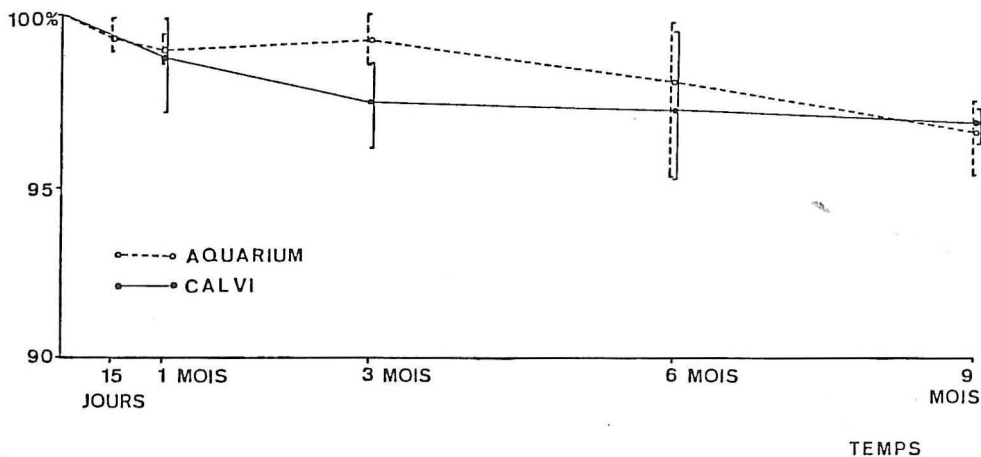


Fig. 2 : Variation de poids dans les prismes de *Pinna* (en % du poids de départ).

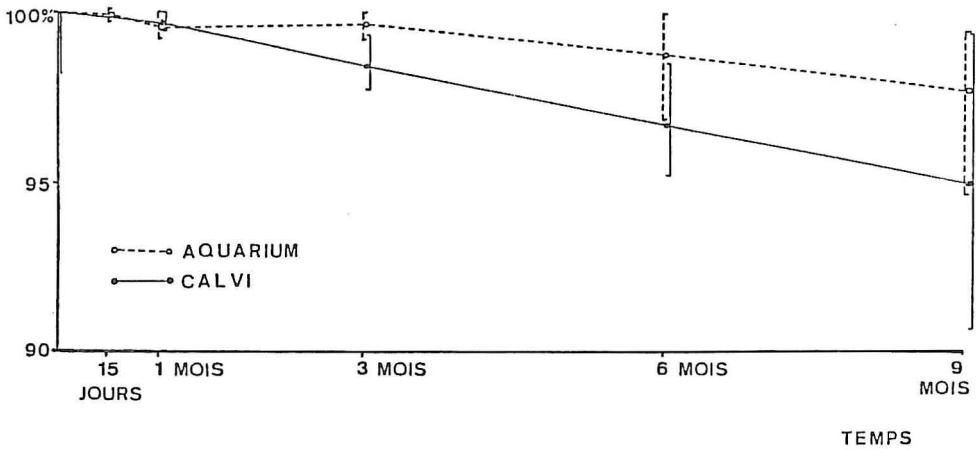


Fig. 3 : Variation de poids dans la nacre de *Nautilus* (en % du poids de départ).

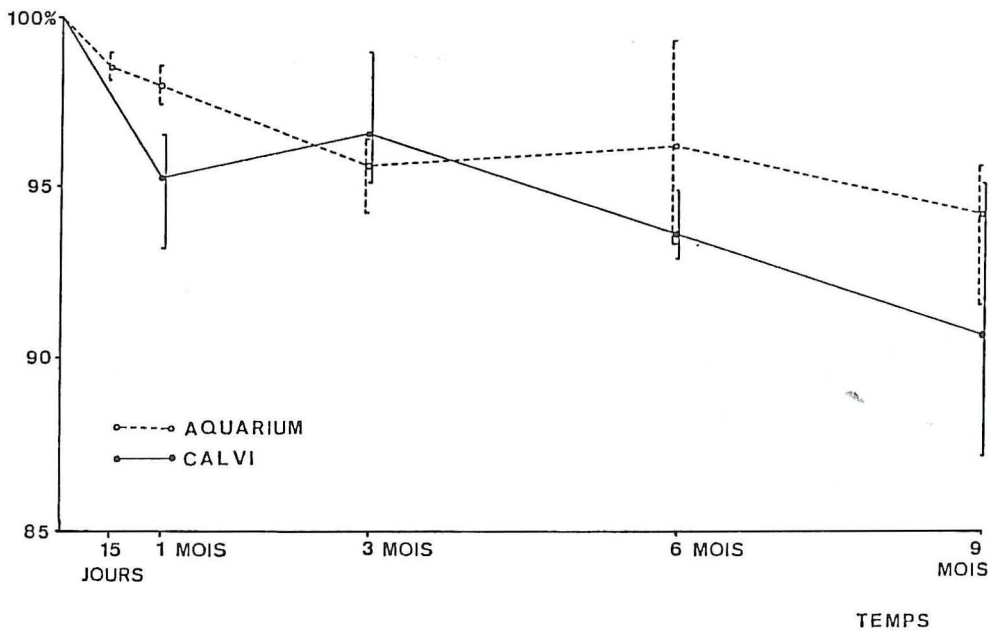


Fig. 4 : Variation de poids chez *Sphaerechinus* (en % du poids de départ).

d'autre part, elle est plus marquée pour les échantillons de plaques de test d'oursin. Ceci est à mettre en relation avec la dissolution différente des carbonates : la calcite magnésienne est plus soluble que l'aragonite, elle-même plus soluble que la calcite.

#### d) dosage de chitine

Le contenu en chitine présente dans les échantillons immergés à Calvi donne les valeurs suivantes :

TABLEAU III

Quantité de chitine présent (en % de la quantité de départ).

Temps d'immersion en anaérobiose (en mois)	Prismes			Nacre		
	poids (en g)	chitine		poids (en g)	chitine	
		(en µg)	(en %)		(en µg)	(en %)
0	1,2155	650,61	100	1,1287	629,62	100
4	2,3931	92,87	7,17	2,6908	510,43	38,87
6	3,3227	91,69	8,31	4,6025	18,54	1,26

Le dosage de chitine effectué sur le test de *Sphaerechinus granularis* n'a révélé aucun apport significatif de ces composants par les micro-organismes intervenant dans la biodégradation.

Les prismes semblent donc subir une dégradation rapide de chitine entre 0 et 4 mois d'anaérobiose avant de se stabiliser par la suite (de 4 à 6 mois d'expérience). La phase préliminaire de dégradation de la chitine (0 à 4 mois) est plus lente dans le cas de la nacre. Par contre, cette dégradation se poursuit et s'amplifie entre 4 et 6 mois d'immersion en anaérobiose. Cette différence peut s'expliquer par l'accessibilité de la trame organique des prismes de *Pinna* (fourreaux péricristallins épais et accessibles sur toute l'épaisseur de la strate) (Simon & Poulicek, 1990) alors que la trame organique de la nacre est sensiblement plus dispersée au sein du minéral et donc moins accessible dans un premier temps.

#### e) dosage de protéines

Les dosages de protéines ont été effectués pour les échantillons immergés à Calvi et pour ceux immergés en aquarium.

On observe une tendance à la diminution de la teneur en protéines au cours du temps, que ces protéines soient péricristallines (solubles dans NaOH) ou intracristallines (solubles dans HCl). Cette dégradation est particulièrement intense dans le cas du test de *Sphaerechinus*.



TABLEAU IV

Dosage de protéines solubles dans NaOH et HCl (en % de la quantité de départ).

LIEU	TEMPS d'immersion	PRISMES		NACRE		TEST D'OURSIN	
		Prot. dans NaOH	Prot. dans HCl	Prot. dans NaOH	Prot. dans HCl	Prot. dans NaOH	Prot. dans HCl
CALVI	0+1	56.38	89.78	84.61	33.85	8.46	12.70
	0+3	57.29	117.05	77.50	29.77	10.61	12.46
	0+6	52.06	120.63	72.80	29.40	5.81	11.80
	0+9	53.78	79.82	69.84	45.97	4.30	5.84
	3+3	58.77	123.22	73.35	42.75	5.00	13.70
	3+6	54.35	80.82	84.09	50.56	2.79	12.54
Aquarium	6+3	52.88	100.32	74.74	62.45	5.34	5.98
	0+0,5	61.20	87.39	93.43	58.66	24.20	14.64
	0+1	61.14	86.00	90.69	58.95	17.93	13.18
	0+3	71.82	126.60	84.50	58.44	13.60	23.41
	0+6	71.63	145.10	78.94	115.72	9.38	26.54
	0+9	65.02	75.84	60.12	48.88	15.59	7.33
	1+1	60.96	83.40	85.48	49.03	8.52	7.84
	1+3	72.03	60.12	80.60	72.96	5.20	22.61
	1+6	61.25	111.28	80.20	106.74	5.15	14.96
	3+3	58.86	113.67	83.06	71.21	6.48	18.78
	3+6	56.94	79.63	79.10	56.47	5.18	5.95
	6+3	51.21	81.81	92.96	76.17	4.28	6.08

La diminution de la quantité de protéines solubles dans NaOH est plus marquée pour les échantillons immergés à Calvi que pour ceux déposés en aquarium, à l'exception de la nacre de nautille. Les phénomènes de biodégradation semblent beaucoup plus réguliers pour les protéines solubles dans NaOH que dans HCl. Dans le cas des protéines extraites par NaOH, les échantillons soumis à la dégradation anaérobie uniquement ont subi une dégradation plus intense que les échantillons placés pendant la même durée dans des conditions de dégradation aérobiques puis anaérobiques. Seuls les prismes immergés en aquarium échappent à cette règle.

#### f) Évaluation des activités enzymatiques

##### f1) Activité enzymatique de l'eau libre interstitielle\*

L'activité enzymatique de l'eau libre interstitielle des jarres provenant de Calvi est  $\pm 2$  fois plus importante que celle provenant de l'aquarium (Figs. 5 et 6). On remarque une baisse d'activité au cours du temps, avec une légère remontée à Calvi entre 3 et 6 mois d'immersion. L'activité des phosphatases présente le même profil que l'activité globale.

\* On sait qu'il n'existe pas d'enzymes tels quels dans l'eau libre : ils sont adsorbés sur la matière organique particulaire (Vives Rego *et al* 1985).

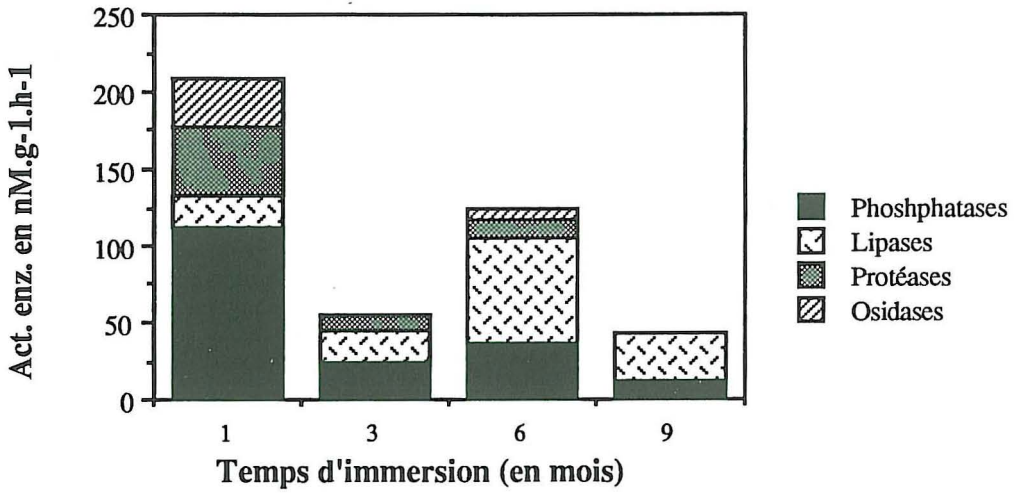


Fig. 5 : Activité enzymatique de l'eau libre interstitielle à Calvi.

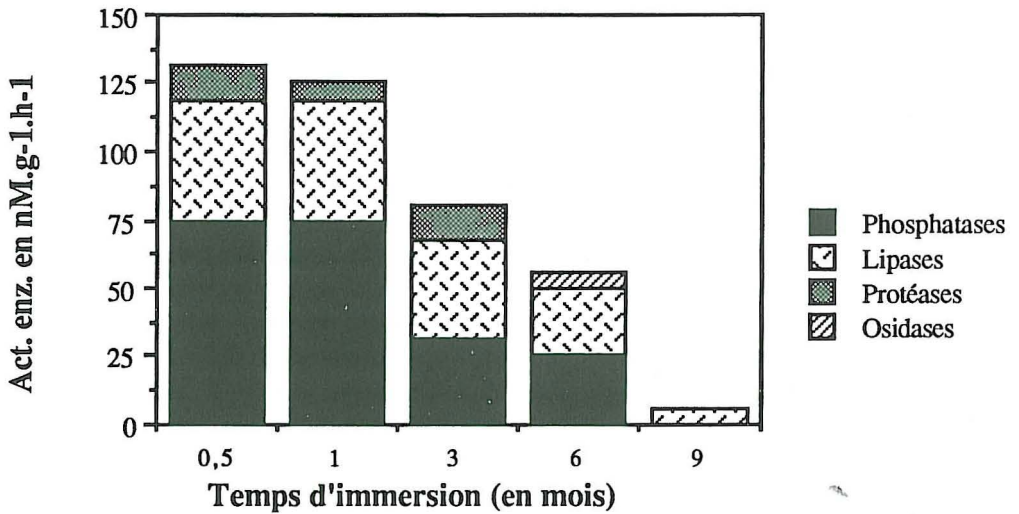


Fig. 6 : Activité enzymatique de l'eau libre interstitielle en aquarium.

L'activité des osidases décroît rapidement, sans doute à cause de la disparition des sucres disponibles. La grande quantité de lipases présentes tout au long de l'expérience peut rendre compte soit d'une hydrolyse de lipides de plus en plus difficilement hydrolysables (acides gras volatils puis non volatils, esters d'acides gras puis lipides cycliques), soit d'une hydrolyse des réserves énergétiques des décomposeurs eux-mêmes.

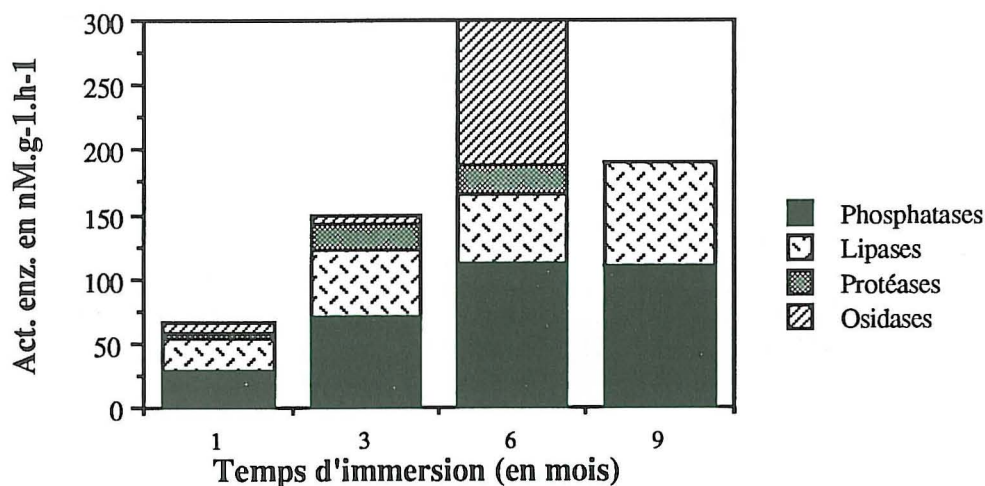


Fig. 7 : Activité enzymatique de l'eau interstitielle liée au sédiment à Calvi.

f2) Activité enzymatique de l'eau liée (adsorbée) au sédiment (Figs. 7 et 8).

Comme pour l'activité enzymatique de l'eau liée (Figs. 5 et 6) l'activité des phosphatases présente le même profil que l'activité globale. L'activité des lipases reste importante tout au long de l'immersion. L'activité enzymatique est maximale pour des durées d'immersion plus longues que dans les deux graphiques précédents : sans doute est-ce dû à la fixation des organismes présents dans l'eau libre sur les particules sédimentaires (il s'agirait en quelque sorte d'un passage d'organismes de l'eau libre vers l'eau liée). L'augmentation de l'activité des phosphatases peut en effet indiquer une phase de colonisation, arrivant à son maximum vers un mois d'anaérobiose en aquarium (Fig. 8) et vers six mois à Calvi (Fig. 7). Pour les échantillons immergés à Calvi, on peut également envisager la possibilité d'une succession de deux escouades successives de colonisation, l'une vers 1 mois d'anaérobiose, dans l'eau libre (Fig. 5), l'autre vers 6 mois d'anaérobiose, adsorbée sur les particules sédimentaires. Nous n'avons pas décelé de présence de protéases ni d'osidases dans l'eau interstitielle liée au sédiment des jarres immergées en aquarium (Fig. 8).

f3) Activité enzymatique des échantillons de nacre provenant des jarres expérimentales (Figs. 9 et 10). Remarquer la différence d'échelle.

Les figures 9 et 10 traduisent une très forte dégradation de la nacre. L'activité mesurée pour des échantillons en provenance de Calvi est dix fois supérieure à celle mesurée pour des échantillons d'aquarium. Ces deux figures montrent une activité enzymatique plus importante entre 3 et 6 mois que vers 3 mois d'anaérobiose. Dans les deux sites d'expérimentation, l'activité chute brutalement entre 6 et 9 mois d'anaérobiose. La figure 9 indique une nette diminution de l'activité des protéases et osidases, sans doute en corrélation avec la disparition de sucres et de protéines directement accessibles par les organismes décom-

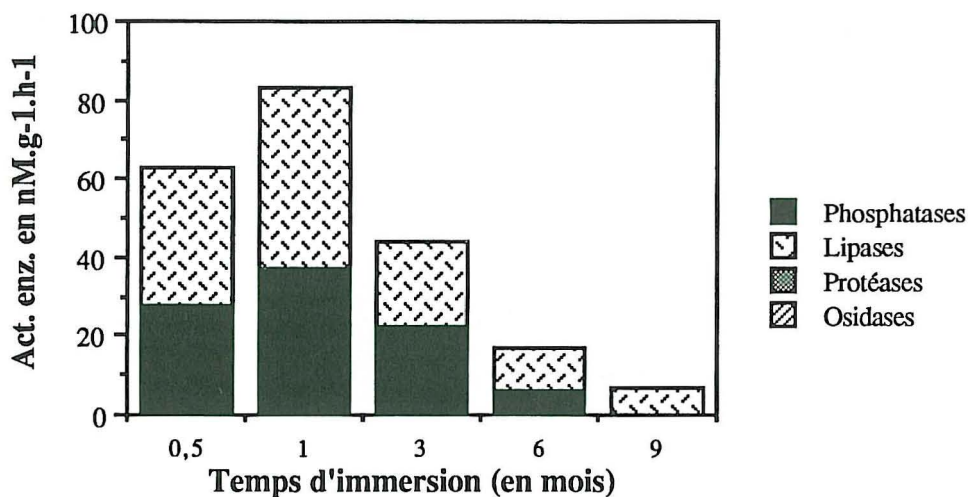


Fig. 8 : Activité enzymatique de l'eau interstitielle liée au sédiment en aquarium.

poseurs ; le confinement imposé par les conditions expérimentales diminue sans doute la quantité de matière organique accessible à ces décomposeurs.

En aquarium (Fig. 10) l'activité des protéases n'est décelable que vers 6 mois : ceci est imputable soit à une colonisation lente, soit à l'activité d'une seconde escouade de colonisation, la première ayant affecté l'échantillon vers 1 mois d'anaérobiose et n'étant donc pas visible sur cette figure.

f4) Activité enzymatique des échantillons de test d'oursin provenant des jarres expérimentales (Figs. 11 et 12).

L'activité enzymatique totale mesurée dans le stéréome d'oursin est de deux à dix fois inférieure à celle mesurée dans la nacre. Comme pour les figures 9 et 10, on constate une recrudescence de l'activité enzymatique vers 6 mois d'anaérobiose (l'activité enzymatique des échantillons immergés 3 mois en aquarium n'était pas quantifiable). L'activité des phosphatases pourrait confirmer le développement d'organismes après 6 mois d'anaérobiose. Nous n'avons pas décelé d'osidases dans l'échantillon immergé 3 mois en aquarium (Fig. 12).

## DISCUSSION

### a,b) dosage du Fe, Mn et S par spectrométrie à plasma et analyse minéralogique

Si les dosages par spectrométrie à plasma permettent d'observer des fluctuations de la concentration en Fe, Mn et S, ils ne précisent pas quel est l'état de ces composés. La cou-



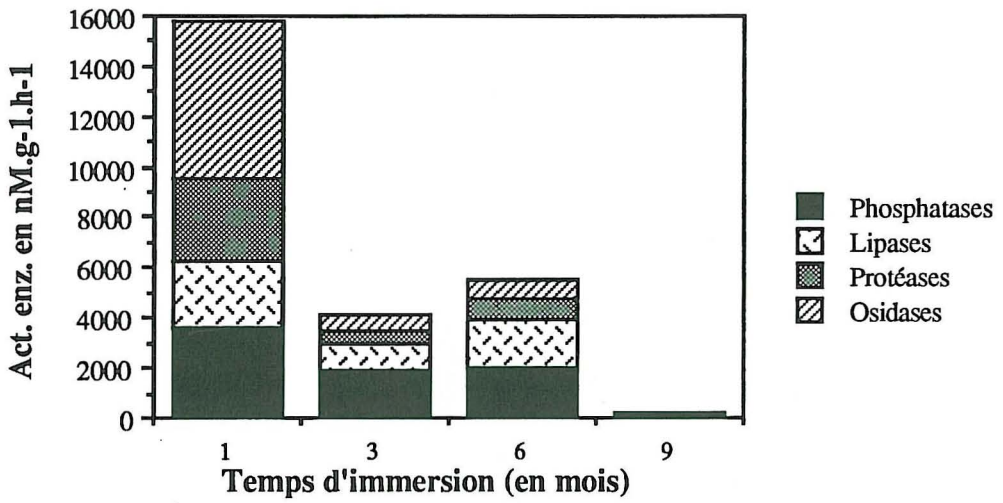


Fig. 9 : Activité enzymatique de la nacre à Calvi.

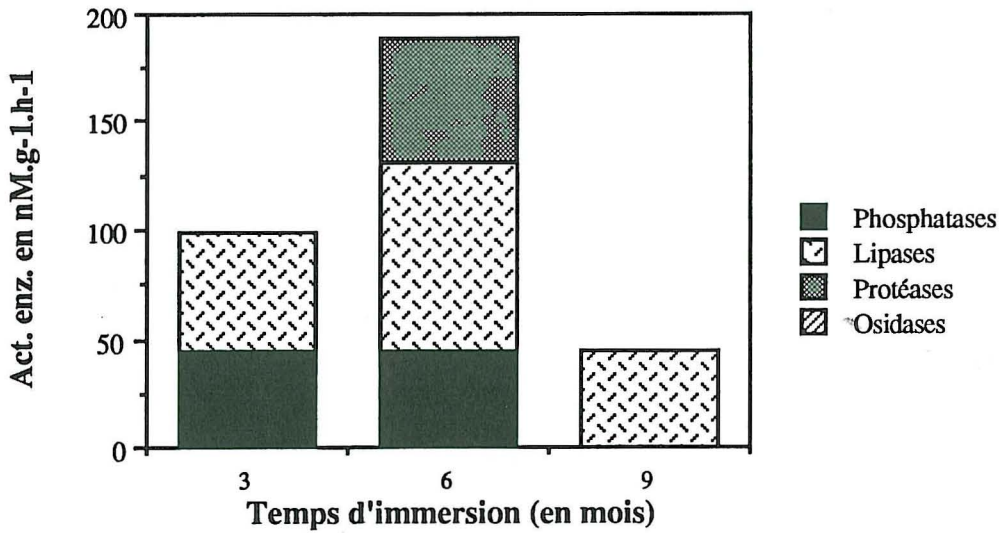


Fig. 10 : Activité enzymatique de la nacre en aquarium.

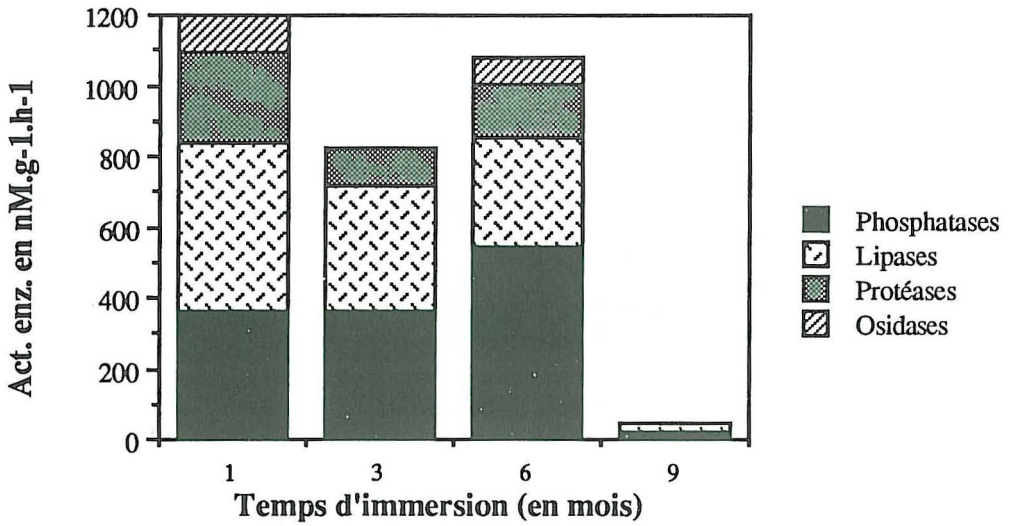


Fig. 11 : Activité enzymatique dans le stercôme d'oursin à Calvi.

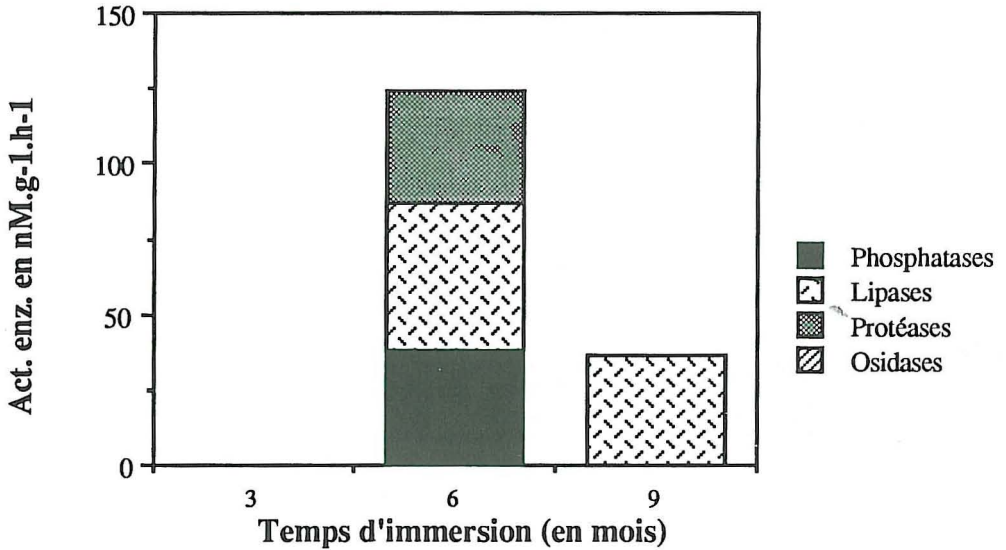


Fig. 12 : Activité enzymatique dans le stercôme d'oursin en aquarium.

leur noire du sédiment et des échantillons pourrait donc être due à des sulfures métalliques, suite à une réduction suivie d'une précipitation du soufre présent dans les coquilles ou à une biodégradation des protéines soufrées. En fonction des échantillons témoins, on constate que les coquilles de mollusques contiennent du soufre en abondance (5 800 ppm dans les prismes, 3 400 ppm dans la nacre). Le sédiment utilisé à Calvi contient plus de 60 % (en poids) de coquilles de mollusques (Poulicek, 1982) et le sédiment de l'aquarium est composé à 100 % de coquilles de mollusques. La grande quantité de soufre présente dans les jarres ou dans le sédiment non dérangé doit vraisemblablement favoriser les réactions chimiques comme la réduction des sulfates. L'odeur caractéristique et l'observation de bulles de sulfure d'hydrogène lors de l'ouverture des jarres expérimentales viennent appuyer cette hypothèse. Le soufre pourrait être présent sous une forme non-cristalline (rendant l'identification en diffraction aux rayons X impossible), ou simplement en concentration inférieure au seuil de détection. D'autres approches ont légalement révélé la présence d'une grande quantité de soufre dans les coquilles de mollusques (Cuif com. pers. à M. Poulicek). Une telle concentration en soufre pourrait s'expliquer par la présence :

- de mucopolysaccharides sulfatés, détectés en histochimie (Poulicek 1982),
- d'acides aminés soufrés. La matrice organique de *Pinna bicolor* contient 1,67 % (en poids) de cystéine et 3,2 % de méthionine (Poulicek 1982) (ce qui permet de rendre compte de la présence d'environ 10 % de la quantité de soufre, soit  $\pm 300$  ppm),
- de chitine sulfate, mais leur mise en évidence n'a montré aucun résultat positif (M.F. Voss com. pers. à A. Simon),
- d'impuretés dans le réseau de  $\text{CaCO}_3$ .

À l'heure actuelle, il n'est pas possible d'aller plus loin dans l'explication du phénomène. Des analyses plus approfondies sont en cours.

### c) variation de poids

Les mesures de perte de poids des échantillons sont malaisées à interpréter : elles sont le bilan général d'un équilibre complexe entre la perte de matériel organique par décomposition, la perte de minéral par dissolution, le gain de matériel organique par colonisation et le gain de minéral par précipitation et adsorption.

La perte de poids remarquée sur les trois types de microstructures ne peut raisonnablement être imputée à l'abrasion, puisqu'il n'y avait pas de macrofaune ni de courant dans les jarres expérimentales closes. Cette perte de poids devrait donc plutôt être imputée à la dissolution du matériel, causée par la baisse du potentiel d'oxydoréduction et la chute du pH. Cette dissolution se poursuivra donc, à long terme, jusqu'à l'éventuelle atteinte de l'équilibre de saturation du milieu (expérience en cours). La matière organique ne représentant que 1,5 à 4 % du poids calcifié des structures squelettiques, la dégradation de la phase organique se remarque peu sur les mesures du poids sec calcifié. La perte de poids plus importante chez *Sphaerechinus* que dans les deux autres types d'échantillons s'explique à la fois par une différence de solubilité entre la calcite magnésienne et la calcite (ou l'aragonite) et par une perte plus rapide de protéines (voir Tabl. IV), consécutive à la disparition du stroma. Les pertes de matériel organique intratrabéculaire sont difficiles à quantifier dans les conditions expérimentales de cette étude.

#### d) Dosage de chitine et de protéines

Concernant la quantité de protéines présentes et de la perte de poids, il n'y a pas de différence significative entre les échantillons reposant dans des voiles de nylon à mailles de 50, 180 et 400  $\mu\text{m}$  (test d'analyse de la variance à 2 facteurs contrôlés au seuil de 5 %). Nous pouvons donc conclure que les organismes décomposeurs impliqués ici ont une taille inférieure à 50  $\mu\text{m}$ , du moins dans la phase de dissémination. Cette idée concorde parfaitement avec les observations en microscopie électronique (Simon & Poulícek, 1990).

Dans le cas des prismes et de la nacre, les protéines solubles dans HCl sont dites "intracristallines" (en fait chaque monocristal est "emballé" dans une couche de protéines non tannées). Les protéines extraites par NaOH, quant à elles, proviennent de la gaine dite "péricristalline" (Crenshaw, 1972), plus hétérogène, tannée, disposée autour des cristallites, eux-mêmes composés de nombreux monocristaux. La trame organique soluble dans NaOH peut, si elle est désorganisée suite à l'action des décomposeurs, devenir en partie soluble dans HCl. Il y aurait donc une possibilité de passage de protéines insolubles dans HCl à une forme soluble. Il faut également préciser que les protéines solubles dans HCl ne représentent que 3 % (dans le cas des prismes) à 5 % (dans la nacre) de la quantité de protéines solubles dans NaOH, pour les échantillons non immergés. Pour ces deux raisons, la quantité de protéines solubles dans NaOH diminue de manière linéaire, tandis que la quantité de protéines solubles dans HCl fluctue beaucoup plus.

En ce qui concerne les échantillons immergés pendant 6 mois en anaérobiose, l'augmentation de la quantité de protéines remarquée pourrait traduire l'activité d'une deuxième escouade de colonisation sur les échantillons (leurs protéines étant dosées au même titre que les protéines présentes dans les échantillons). L'explication de la succession de deux escouades de colonisation pourrait être le changement des conditions environnementales. Sans doute, comme le suggèrent Brisou (1976) et Paerl et Prufert (1987), les décomposeurs anaérobies vivent-ils dans une certaine léthargie, jusqu'à ce qu'un apport de matière nutritive leur permette de se développer, très rapidement. Lorsque toute la matière nutritive est consommée et que les conditions du milieu ne leur conviennent plus, ils reprennent leur mode de vie ralenti.

L'examen des résultats du dosage de chitine (Tabl. III) révèle une disparition de chitine beaucoup plus rapide et importante que la disparition de protéines [tout comme en conditions aérobiques (Poulícek *et al.*, 1988)].

Il semble bien que la trame organique (essentiellement chitinoprotéique) des coquilles de mollusques représente un apport d'énergie suffisant au développement des endolithes. Les clichés au microscope électronique à balayage confirment une désorganisation de la trame organique des structures squelettiques (Simon & Poulícek, 1990) contemporaine de la colonisation des sédiments organodétritiques par des micro-organismes décomposeurs.

Contrairement aux idées généralement exprimées dans la littérature, la dégradation en anaérobiose apparaît aussi rapide qu'en aérobiose puisque les échantillons ayant subi 6 mois et 9 mois de dégradation anaérobique (cf. tableau IV) contiennent respectivement moins de protéines que les échantillons ayant subi 3 mois de dégradation aérobie suivis



de 3 mois de dégradation anaérobie (notée 3+3 dans le tableau I) et 3 mois d'aérobiose puis 6 mois d'anaérobiose (3+6) ou 6 mois d'aérobiose puis 3 mois d'anaérobiose (6+3). Les phénomènes de décomposition aérobie semblent donc plus lents que ceux intervenant lors de la dégradation anoxique et qu'en eau profonde (Poulicek, 1983). Cette différence de vitesse de décomposition peut résulter d'une disproportion de solubilité des carbonates en eau de mer. Les eaux de surface sont sursaturées en carbonates ; les structures squelettiques calcifiées ne se dissolvent donc pas, ou très localement, sous l'action des décomposeurs (Poulicek, 1982 ; Poulicek *et al.*, 1988). En eau profonde, la sous-saturation en carbonates peut jouer le même rôle que la diminution de pH observée en anaérobiose dans les jarres expérimentales : la dissolution des échantillons favorise l'accès des décomposeurs à la trame organique, induisant ainsi une vitesse de dégradation plus élevée.

Il faut également remarquer que les sédiments à haute préservation en carbone sont tous anoxiques (Henrichs & Reeburgh, 1987). Sans doute est-ce dû au trop grand apport de matière organique rendant le sédiment anoxique par consommation de l'oxygène présent par les décomposeurs aérobies. L'anaérobiose n'apparaît, dès lors, plus comme la cause mais comme la conséquence de la préservation et donc de l'accumulation de la matière organique.

La matière organique enfouie dans les sédiments anaérobiques a préalablement subi une altération aérobie à l'interface eau-sédiment et dans les couches superficielles du sédiment. Cette altération a eu pour conséquence d'éliminer les composés les plus labiles des trames organiques comprises dans les formations squelettiques calcifiées. Ainsi, seuls les composés dits "réfractaires" (molécules très stables chimiquement) atteignent les couches anoxiques du sédiment, et la dégradation de ces composés sera lente.

#### **e) mise en évidence des activités enzymatiques**

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité enzymatique sont du même ordre de grandeur que dans le cas des expériences effectuées en aérobiose (Poulicek *et al.*, 1988), malgré le fait que les décomposeurs et les réactions métaboliques utilisées par ces organismes soient très différentes. Dans la mise en évidence de l'activité enzymatique comme dans le cas du dosage des protéines, les mesures concernant les échantillons ayant subi 6 et 9 mois de dégradation anaérobie sont comparables aux mesures effectuées pour les échantillons ayant subi respectivement 3 mois de dégradation aérobie puis 3 mois de dégradation anaérobie (3+3) et 3 mois de dégradation aérobie puis 6 mois de dégradation anaérobie (3+6), ou 6 mois de dégradation aérobie puis 3 mois de dégradation anaérobie (6+3). L'évaluation des activités enzymatiques s'accorde donc avec les dosages chimiques.

Pour la mise en évidence de l'activité enzymatique, la plupart des figures montrent deux maxima : vers 1 et 6 mois d'anaérobiose. La première diminution d'activité pourrait suivre la disparition des composés organiques facilement accessibles aux décomposeurs ou facilement métabolisables. Après, l'activité augmente à nouveau ; ceci est interprété comme le développement d'une deuxième escouade de colonisation, telle qu'elle est révélée par le dosage de protéines. Les dosages d'activité enzymatique pour les échantillons de nacre et

de test d'oursin immergés pendant un mois en anaérobiose en aquarium n'ont pu être effectués. Cet accident empêche peut-être d'observer l'activité de la première escouade de colonisation en aquarium.

La succession de deux vagues de colonisation pourrait s'expliquer par un changement des conditions du milieu : accumulation ou disparition de métabolites, ou encore changement du potentiel d'oxydo-réduction.

Du point de vue de la succession des types d'enzymes actifs, l'activité des osidases est plus marquée pour les temps courts, les sucres étant des molécules facilement métabolisables. L'activité des lipases est relativement stationnaire et constante au cours du temps ; elle peut être due soit à une hydrolyse de lipides dans les échantillons, perdurant suite à l'hydrolyse de différents types de lipides, de plus en plus résistants à la décomposition [comme dans le cas de la dégradation du plancton (Loizeau, Dave & Poulicek, en préparation)], soit à l'hydrolyse des substances de réserves des décomposeurs. Cette hydrolyse de réserves peut être soit intracellulaire, soit résulter de la dégradation d'un type de décomposeurs par un autre type (prédation ou saprophytisme).

Il faut également observer la différence d'échelle dans la mesure d'activité enzymatique de la nacre et du test d'oursin : celle-ci résulte de la disproportion entre la teneur en protéines intrinsèques et l'architecture tridimensionnelle de ces deux structures squelettiques. Toutefois, il faut aussi tenir compte du fait que les mesures sont rapportées au poids frais de l'échantillon et que le test d'oursin, par son architecture en trabécules retient beaucoup d'eau. Le rapport poids frais/poids sec est de  $\pm 1,1$  pour la nacre et de  $\pm 2$  pour le test d'oursin. Cette différence de teneur en eau ne suffit pas à expliquer pourquoi l'activité enzymatique est  $\pm 10$  fois plus importante dans la nacre que dans le test d'oursin. Il faut donc penser que la teneur et la disposition des protéines sont responsables de la différence d'activité enzymatique. A noter aussi une très grande différence entre l'activité enzymatique de la nacre et du stéréome d'oursin à Calvi et en aquarium (Figs. 9 à 12), attribuable à la pauvreté de l'aquarium en décomposeurs anaérobies.

## CONCLUSION

Les vitesses de biodégradation et l'intensité des activités enzymatiques varient grandement en fonction du type de microstructure considéré. On peut les corrélérer avec la concentration et surtout avec la disposition de la matière organique dans les trois types de structures squelettiques calcifiées étudiées.

La nature de la phase minérale joue un rôle dans les phénomènes de dissolution.

Dans les conditions expérimentales fixées, la biodégradation anoxique est aussi rapide que la biodégradation aérobie, pour un même matériel.

Les évaluations des activités enzymatiques ont révélé les mêmes types d'hydrolases dans le matériel soumis à la dégradation aérobie que dans le matériel soumis à la dégradation anaérobie pour des conditions expérimentales identiques et des temps équivalents. Les sédiments anoxiques pourraient, à première vue, être habités par des organismes moins effi-

caces dans les réactions de biodégradation, simplement parce que seuls les composés les plus réfractaires à la dégradation atteignent la zone anoxique du sédiment. En effet, il ne faut pas oublier que les structures squelettiques atteignant la zone anoxique du sédiment ont, au préalable, subi l'action des décomposeurs aérobies.

Nous pouvons ainsi considérer le sédiment anoxique comme faisant partie à part entière des chaînes trophiques et des cycles biogéochimiques. Les phénomènes conduisant à la fossilisation et la préservation de trames organiques au sein de formations squelettiques, de même que la formation de pétroles et autres combustibles fossiles apparaissent dès lors comme des cas exceptionnels, localisés aux endroits de sédimentation très intense, permettant à la matière organique d'être rapidement soustraite à l'activité microbienne.

#### REMERCIEMENTS

Nos remerciements s'adressent à Mr le Professeur Jeuniaux pour son aide et ses conseils. Merci également à Mme M.F. Voss. Cette étude a pu se dérouler à Calvi avec l'aide du Dr D. Bay, Directeur de la Station océanographique STARESO et en aquarium grâce au Dr J. Voss, Conservateur de l'Aquarium Public de l'Université de Liège. Merci également à Mlle C. Toussaint pour les dosages.

Ce travail a été réalisé avec l'appui du Fonds pour la Recherche Fondamentale et Collective, Crédit n° 2.4506.83.

Nous remercions également le Fonds National de la Recherche Scientifique Médicale dont le soutien financier a permis l'acquisition de l'installation spectrométrique (contrat Loterie Nationale n° 9.4596.83).

#### BIBLIOGRAPHIE

- BRISOU, J., 1976. Activité bactérienne en milieu marin. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.*, 23 (6) : 215-216.
- CHAVE, K.E., K.S. DEFFEYES, P.K. WEYL, R.M. GARRELS & M.E. THOMPSON, 1962. Observations on the solubility of skeletal carbonates in aqueous solutions. *Science*, 137 : 33-34.
- CRENSHAW, M.A., 1972. The soluble matrix from *Mercenaria mercenaria* shell. *Biominéralisation*, 6 : 6-11.
- GLENN, C.R. & M.E. ARTHUR 1985. Sedimentary and geochemical indicators of productivity and oxygen contents in modern and ancient basins : the holocene Black sea as the "type" anoxic basin. *Chem. Geol.*, 48 : 325-354.
- HARGRAVE, B.T., 1972. Aerobic decomposition of sediment and detritus as a function of particle surface area and organic content. *Limnol. Oceanogr.*, 17 (4) : 583-596.
- HENRICH, S.M. & W.S. REEBURGH, 1987. Anaerobic mineralization of marine sediments organic matter : rates and the role of anaerobic processes in the oceanic carbon economy. *Geomicrobiology Journal*, 5 (314) : 191-237.
- JEUNIAUX, C., 1963. Chitine et chitinolyse, un chapitre de la biologie moléculaire. *Masson et Cie éd., Paris*, 181 p.
- JEUNIAUX, C., 1965. Chitine et Phylogénie : application d'une méthode enzymatique de dosage de la chitine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 45 (2) : 2267-2278.
- MAY, J.A. & R.D. PERKINS, 1979. Edolithic infestation of carbonate substrates below the sediment-water interface. *J. Sed. Petrol.*, 49 (2) : 357-378.



- PEARL, H.W. & L.E. PUFFERT, 1987. Oxygen-poor microzones as potential sites of microbial  $N_2$  fixation in nitrogen-depleted aerobic marine waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (5) : 1078-1087.
- POULICEK, M., 1982. Coquilles et autres structures squelettiques des mollusques : composition chimique, biomasse et biodégradation en milieu marin. *Thèse de Doctorat en Sci. Zool., Université de Liège*, 180 p (n. publ.).
- POULICEK, M., 1983. Patterns of mollusk shell biodegradation in bathyal and abyssal sediments. *J. Moll. Study*, 12A : 136-141.
- POULICEK, M. & C. JEUNIAUX, 1982. Biomass and biodegradation of mollusk shell chitin in some marine sediments. *Proc. 2<sup>nd</sup> Internat. Conf. on Chitin and Chitosan Sapporo (Japan)*. S. Hirano and S. Tokura editors.
- POULICEK, M. & M.F. JASPAR-VERSALI, 1984. Biodégradation de la trame organique des coquilles de Mollusques en milieu marin : action des micro-organismes endobiontes. *Bull. Soc. R. Sci. de Liège*, 53 : 114-126.
- POULICEK, M., M.F. JASPAR-VERSALI & G. GOFFINET, 1981. Étude expérimentale des coquilles de mollusques au niveau des sédiments marins. *Bull. Soc. R. Sci. de Liège*, 11-12 : 513-518.
- POULICEK, M., G. GOFFINET, C. JEUNIAUX, A. SIMON & M.F. VOSS-FOUCART, 1988. Early diagenesis of skeletal remains in marine sediments : a 10 year study. *Actes du colloque : "Recherches océanographiques en Mer Méditerranée"*. Institut de Recherches Marines et d'interactions Air-Mer ed., pp 107-124.
- RAUP, D.M. & S.M. STANLEY, 1978. Principles of paleontology. *Freeman and company ed.*, (San Fransisco), 481 p.
- REISSIG, J. L., J.C. STROEMINGER & L.F. LELOIR, 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetamino sugar. *J. Biol. Chem.*, 217 : 959-966.
- SCHACTERLE, G.R. & R.L. POLLACK, 1973. A simplified method for the qualitative assay of small amounts of protein in biologic material. *Analytical Biochemistry* 51 : 654-655.
- SIMON, A. & M. POULICEK, 1990. Biodégradation anaérobie des structures squelettiques en milieu marin : I approche morphologique. *Cah. Biol. Mar.*, 31 : 95-105.
- STEIN, R., J. RULLKOETTER & D. WELTE, 1986. Accumulation of organic-carbon rich sediments in the late Jurassic and Cretaceous Atlantic ocean. A synthesis. *Chemical Geology*, 56 : 1-32.
- VIVES REGO, J., G. BILLEN, A. FONTIGNY & M. SOMVILLE, 1985. Free and attached proteolytic activity in water environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 21 : 245-249.