

# Étude en laboratoire de la dégradation de la matière organique en eaux estuariennes et côtières ; variations des stérols

Guy THOUMELIN <sup>a</sup>, Yanic MARTY <sup>a</sup>, Pierre LE CORRE <sup>a</sup>, Alain AMINOT <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire d'Océanographie Chimique, URA/CNRS n° 322, Université de Bretagne Occidentale, 6, avenue Le Gorgeu, 29287 Brest Cedex, France.

<sup>b</sup> Département Environnement Littoral, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France.

Reçu le 19/11/88, révisé le 24/4/89, accepté le 30/6/89.

## RÉSUMÉ

Les variations des stérols ont été examinées lors de la décomposition de la matière organique dans des eaux de mer côtières (rade de Brest, France). Les expériences ont été menées en laboratoire, à l'obscurité et à une température constante de 19°C, sur des eaux de mer filtrées et non filtrées de différentes salinités. Les variations des stérols (cholestérol, coprostanol, campestérol, stigmastérol et  $\beta$ -sitostérol) montrent que la dégradation de ces composés ne correspond pas à un phénomène simple. Les teneurs en stérols augmentent au cours des premiers jours de l'incubation : le phénomène est particulièrement marqué pour le  $\beta$ -sitostérol, le cholestérol et surtout le stigmastérol dans l'eau de faible salinité. Il est à noter que la filtration à 1  $\mu$ m ne supprime pas le processus : à chaque salinité, la formation des stérols est aussi importante dans l'eau filtrée que dans l'eau non filtrée. Les stérols formés lors des premiers jours de l'incubation sont par la suite entièrement dégradés. La décomposition des stérols est relativement rapide : ces produits sont dégradés en quasi-totalité au bout de vingt à vingt-cinq jours. Deux processus peuvent être à l'origine des augmentations de concentrations des stérols lors de la dégradation de la matière organique :

- la dégradation par des exoenzymes microbiennes de composés organiques complexes provenant de végétaux supérieurs, d'organismes planctoniques, ou encore d'origine anthropogénique ;
- le développement d'organismes autres que des bactéries, qui pourraient être des champignons, des moisissures ou encore des bactériophages de type microflagellés.

*Oceanologica Acta*, 1990. 13, 1, 53-60.

## ABSTRACT

Laboratory investigation of the degradation of organic matter in estuarine and coastal waters : sterols variations

Sterol variations were examined during the process of degradation of organic matter in coastal seawater from the rade of Brest, France. The experiments were conducted in the laboratory, in darkness and at constant temperature of 19°C, on filtered or non-filtered seawaters of different salinities. The variations of the sterols (cholesterol, coprostanol, campesterol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol) show that the degradation of these compounds does not correspond to a simple phenomenon. Sterol concentrations increase during the first days of incubation ; this is particularly notable in the case of  $\beta$ -sitosterol, cholesterol and especially stigmasterol in water of low salinity. It is also to be noted that filtration at 1  $\mu$ m does not suppress the process: for each salinity, the formation of sterols in filtered water is as important as that observed in non-filtered water. The sterols formed during the first days of incubation are subsequently degraded, decomposition occurring at a relatively rapid pace and being almost complete after twenty or twenty-five days. Two processes can be at the origin of the

augmentations of concentrations of sterols during degradation of the organic matter: (a) the degradation by microbial exoenzymes of complex organic compounds. These compounds may originate from higher plants or planktonic organisms, or may be of anthropogenic origin; (b) the development of organisms other than bacteria, which could be fungi, yeasts or perhaps bacterivorous microflagellates.

*Oceanologica Acta*, 1990. 13, 1, 53-60.

## INTRODUCTION

La matière organique dans l'eau de mer peut être classée en deux fractions, la première utilisable par les micro-organismes, la seconde de nature peu dégradable (Menzel et Ryther, 1968; Menzel, 1970; Ogura, 1970...). Dans les eaux profondes la fraction labile est quantitativement peu importante: la matière organique dissoute est essentiellement de nature peu dégradable (Barber, 1968); les molécules labiles détectées au sein de la matière organique particulaire (Wakeham et Canuel, 1988) se situent à des teneurs relativement faibles. La fraction dégradable s'avère nettement plus marquée dans les eaux superficielles (Ogura, 1972). Dans les eaux côtières, en raison d'une production biologique plus soutenue et aussi d'apports en matière organique d'origine terrestre, l'importance de la fraction biodégradable peut augmenter notablement (Ogura, 1975). La fraction difficile à dégrader est constituée principalement de molécules complexes, probablement de type « acide humique » (Bada et Lee, 1977). Les molécules simples (acides aminés, acides gras, alcanes, monosaccharides, stérols...) font partie de la fraction dégradable. Ces molécules sont issues du métabolisme des organismes marins (Bada et Lee, 1977); ils peuvent aussi provenir de rejets d'origine agricole, industrielle ou urbaine. Les stérols jouent un rôle essentiel comme composants architecturaux des membranes cellulaires; ce sont également des pré-curseurs des hormones stéroïdiques et à ce titre interviennent dans la croissance et la reproduction des organismes (Chapman *et al.*, 1985; Goodwin, 1985). Dans l'eau de mer non polluée, la majeure partie des stérols provient des algues planctoniques ou benthiques et du zooplancton; les micro-organismes, tels les champignons et les moisissures, et les invertébrés marins sont des sources secondaires (pour une revue plus complète à ce sujet voir notamment: Patterson, 1971; Scheuer, 1973; Weete, 1973; Goad, 1978; Volkman, 1986). Aux stérols d'origine marine s'ajoutent dans les eaux côtières les stérols d'origine terrestre issus principalement des végétaux supérieurs. Dans les zones perturbées par des rejets urbains, le coprostanol (cholestane-5 $\beta$ -ol-3 $\beta$ ), stérol d'origine fécale, est aussi détecté (Walker *et al.*, 1982).

Différents travaux ont été menés sur les stérols dans l'eau de mer (Saliot et Barbier, 1973; Saliot, 1975; Gagosian, 1975; 1976; Tusseau *et al.*, 1978; Gagosian et Nigrelli, 1979; Tusseau, 1980; Barbier *et al.*, 1981; Gagosian *et al.*, 1982; Saliot *et al.*, 1982). Ces composés apparaissent comme des marqueurs géochimiques

importants: leur distribution dans la colonne d'eau fournit des informations sur l'origine de la matière organique, les processus de transformation qu'elle subit, et aussi sur les mécanismes qui régissent son transport. Peu de travaux ont jusqu'à présent été menés sur la décomposition des stérols au sein de la matière organique. Lee *et al.* (1980) ont étudié leurs variations lors de la dégradation de matériel végétal; Matsumoto (1983) a examiné leurs variations en eau de rivière polluée. Ces travaux mettent en évidence que les stérols sont des produits relativement faciles à dégrader; ils montrent aussi que les processus de dégradation sont complexes. Il est à noter que, jusqu'à présent, la décomposition de la matière organique dans l'eau de mer a été examinée essentiellement de manière globale, les variations du carbone étant principalement prises en compte [on se reportera à Skopintsev (1981) pour une revue du sujet; Aminot *et al.*, 1986]. Dans ce travail nous examinons les variations des stérols lors de la décomposition de la matière organique dans différentes eaux littorales, prélevées en rade de Brest (Bretagne occidentale). Les expériences ont été menées *in vitro* sur des volumes d'eaux de mer isolés de leur milieu d'origine. Si ce type d'expérimentation présente différents inconvénients (effets de paroi, sédimentation des particules...), il permet par contre de s'affranchir de problèmes majeurs liés au déplacement rapide des masses d'eaux et aux phénomènes de mélange qui sont accentués dans les systèmes côtiers.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Prélèvement. Conditions expérimentales

Trois eaux de mer de salinités différentes (3, 13 et 34) ont été prélevées au mois de mai 1983 en rade de Brest (Bretagne occidentale). Chaque eau a été répartie dans deux séries de flacons. La première série (flacons de volume 2,5 l) a permis d'examiner les variations des stérols; la seconde (flacons de 0,5 l) a permis de suivre les variations du carbone organique et des éléments nutritifs (Thoumelin, 1988). Afin d'assurer une décomposition dans des conditions aérobies, les flacons n'ont pas été remplis au maximum de leur capacité. Le volume d'air emprisonné a servi de réserve supplémentaire en oxygène. Les expériences ont porté sur les eaux de mer non filtrées, et aussi sur les eaux de mer filtrées sur Whatman GF/C (diamètre de pore moyen 1  $\mu$ m). Les incubations ont été menées à l'obscurité et à température constante (19°C). Elles se sont déroulées sur une période de deux mois.

**Techniques analytiques**

La salinité (S) a été mesurée à l'aide d'un salinomètre Guildine « Auto-Sal » (précision  $\pm 0,005$ ). Le pH a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre Tacussel PHN-75, avec une précision de  $\pm 0,01$  unité pH. La chlorophylle *a* et la phaeophytine ont été analysées selon la méthode de Lorenzen (1967). La précision de la mesure est de  $\pm 15\%$ . Le carbone organique particulaire (COP) est dosé à l'aide d'un analyseur CHN de type Perkin Elmer modèle 240. Afin d'éliminer le carbone minéral, les filtres ont été traités avant l'analyse par des vapeurs d'acide. Pour un niveau de concentration de  $300 \mu\text{g.l}^{-1}$  la précision de la mesure a été estimée à  $\pm 20 \mu\text{g.l}^{-1}$ . Le carbone organique dissous (COD) a été mesuré selon la méthode automatique en flux continu de Schreurs (1978) modifiée; sous nos conditions expérimentales la précision est de  $\pm 0,03 \text{ mg.l}^{-1}$  pour les concentrations inférieures à  $1 \text{ mg.l}^{-1}$ , et de  $3\%$  pour les concentrations supérieures.

Les stérols, après extraction de l'eau de mer et séparation en chromatographie liquide haute performance (CLHP), sont analysés en chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire. Chaque échantillon (2,5 l) est extrait en totalité par deux fois à l'aide de chloroforme; la première extraction est effectuée par 25 ml au pH de l'eau de mer, la seconde par 20 ml à  $\text{pH} < 2$ . L'extrait organique ainsi recueilli est évaporé à sec. Il est repris par une solution méthanolique de trifluorure de bore (14 %), et chauffé à  $100^\circ\text{C}$  pendant 10 minutes. Nous avons vérifié que le traitement libérait les stérols des esters sans les dégrader. Après extraction au  $\text{CS}_2$  et reprise par un mélange hexane-isopropanol, les stérols sont isolés des autres constituants lipidiques par CLHP sur colonne de silice selon la méthode de Hennion *et al.* (1983) modifiée. La phase mobile utilisée est un mélange d'hexane et d'isopropanol; le pourcentage d'isopropanol augmente de 0 à 5 %, et ceci par paliers (step-gradient). La détection est réalisée en ultraviolet à 206 nm. Les conditions de séparation ont été mises au point à l'aide de solutions de standards. Avant l'injection en chromatographie en phase gazeuse, les stérols sont silylés avec du N-méthyl N-triméthyl silyl trifluoroacétamide ( $60^\circ\text{C}$ , 2 h). Ils sont ensuite analysés à l'aide d'un chromatographe Carlo-Erba « Fracto-Vap 2350 » équipé d'une colonne capillaire en verre de longueur 25 m, de diamètre interne 0,25 mm, garnie de phase SE52. Les conditions chromatographiques sont les suivantes: injecteur du type « splitless »; détecteur à ionisation de flamme; programmation de température de 110 à  $280^\circ\text{C}$  à  $6^\circ\text{C.min}^{-1}$  (après injection à température ambiante),

puis palier à  $280^\circ\text{C}$  pendant 15 minutes. Les différents stérols ont été identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec ceux de produits standards. L'identification a été confirmée par injection de certains échantillons en chromatographie en phase gazeuse associée à un spectromètre de masse. Les teneurs en stérols ont été calculées à partir des surfaces des pics mesurées par un intégrateur Hewlett Packard 3388A. Le cholestane, ajouté en quantité connue dans chaque échantillon avant l'injection en chromatographie en phase gazeuse, a servi de standard interne. Pour un niveau de concentration de l'ordre de  $1,0 \mu\text{g.l}^{-1}$ , la précision de la mesure est de  $\pm 10\%$ .

Cinq stérols ont été identifiés dans les différentes eaux étudiées :

- deux stérols à 27 atomes de carbone, le cholestène-5 ol-3  $\beta$  (cholestérol), le cholestane-5  $\beta$  ol-3  $\beta$  (coprostanol);
- un stérol à 28 atomes de carbone, le méthyl-24 cholestène-5 ol-3  $\beta$  (campestérol);
- deux stérols à 29 atomes de carbone, l'éthyl-24 cholestadiène-5-22 ol-3  $\beta$  (stigmastérol), l'éthyl-24 cholestène-5 ol-3  $\beta$  ( $\beta$ -sitostérol).

Afin de simplifier la rédaction, les noms usuels des stérols sont par la suite utilisés. Aucune analyse de la configuration du carbone n° 24 des stérols à 28 et 29 atomes de carbone n'a été réalisée. Ce carbone peut avoir deux configurations  $\alpha$  ou  $\beta$ . Les noms usuels sont en toute rigueur ceux des épimères ayant la configuration  $\alpha$  (Scheuer, 1973); dans le cas présent aucune déduction sur la configuration épimérique du carbone n° 24 ne peut être déduite de leur utilisation.

**Caractéristiques des eaux de mer**

Les teneurs en chlorophylle *a* sont élevées dans les eaux de salinité 13 et 34 (tab.). Ceci est lié à la période de prélèvement (printemps) et au caractère fortement eutrophe de la rade de Brest (Delmas, 1981; Senior, 1986). Les teneurs sont plus faibles dans l'eau de salinité 3; les eaux dessalées de l'estuaire de l'Élorn sont trop turbides pour permettre un développement soutenu du phytoplancton (Senior, 1986). Les proportions élevées en phaeopigments, notamment dans les eaux de salinité 3 et 13, traduisent la présence de matière organique végétale détritique endogène ou apportée par la rivière Élorn. Les teneurs en COD sont comprises entre 3 et  $4 \text{ mg.l}^{-1}$  (tab.). Elles sont légèrement supérieures aux valeurs généralement obtenues dans les milieux côtiers et estuariens ( $0,7$  à  $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ , MacKinnon, 1981) et se situent plus dans la gamme de concentration observée dans les eaux fluviales ( $1$  à  $10 \text{ mg.l}^{-1}$ , MacKinnon, 1981; 3 à

Tableau  
Caractéristiques des eaux de mer.  
*Seawater characteristics.*

Salinité	pH	(COD) ( $\text{mg.l}^{-1}$ )	(COP) ( $\text{mg.l}^{-1}$ )	Chlorophylle- <i>a</i> ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	Phaeopigments ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	Stérols totaux ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )
3,00	7,85	3,75	2,43	2,4	6,6	3,8
13,25	7,96	3,28	1,60	9,2	5,5	5,3
33,81	8,20	3,14	0,37	9,5	1,2	0,3

10 mg.l<sup>-1</sup>, Romankevich, 1984). La concentration en COD de l'eau de salinité 34 est plus importante que les teneurs habituelles des eaux de salinité supérieure à 30, qui sont de l'ordre de 1 mg.l<sup>-1</sup> (El Sayed, 1988). Ceci résulte d'une contamination de cette eau par des traces d'éthanol lors de son transvasement. Les concentrations en stérols n'ayant pas été modifiées, les variations de ces composés ont été néanmoins prises en compte. Les concentrations en COP varient entre 0,4 et 2,5 mg.l<sup>-1</sup> (tab.). Elles sont relativement comparables aux teneurs observées en eaux côtières et estuariennes (0,01 à 2 mg.l<sup>-1</sup>; MacKinnon, 1981). La proportion de carbone organique particulaire par rapport au carbone organique total est respectivement de 39 et 33 % dans les eaux de salinité 3 et 13. Ces valeurs, relativement élevées, sont comparables à celles qui sont observées dans les eaux estuariennes, et qui peuvent atteindre 40 % (Meybeck, 1982). Les concentrations en stérols totaux (tab.) varient entre 0,3 et 5,3 µg.l<sup>-1</sup>. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles déterminées en eaux côtières (entre 0,1 et 20 µg.l<sup>-1</sup>) par différents auteurs (Kanazawa et Teshima, 1971; Saliot et Barbier, 1973; Tusseau, 1980). L'eau marine (S=34), riche en phytoplancton, est nettement plus pauvre en stérols que les eaux de salinité 3 et 13. Dans le cas présent, les teneurs en stérols ne semblent pas liées de manière évidente à la présence d'organismes phytoplanctoniques.

## RÉSULTATS

### Dégradation de la matière organique dissoute (MOD)

La décomposition de la matière organique dissoute est représentée par les variations du COD (fig. 1). Les teneurs en carbone diminuent en fonction du temps. On observe cependant, pour les eaux de salinité 3 et 13, une légère augmentation des concentrations (respectivement 0,16 et 0,13 mg.l<sup>-1</sup>) au cours des premiers jours d'incubation. Ces variations sont comparables à l'incertitude de mesure ( $\pm 0,12$  mg.l<sup>-1</sup> pour une teneur en COD de 4 mg.l<sup>-1</sup>), et n'ont donc pu être considérées comme réellement significatives. Les courbes  $\ln(\text{COD})=f(t)$  (fig. 2) mettent en évidence que la dégradation s'effectue en deux phases dans les eaux de salinité 3 et 13 (l'eau de salinité 34, enrichie en COD, n'a pas été considérée). Durant chaque phase, aux erreurs analytiques près, la dégradation peut être représentée par une cinétique de premier ordre. La première phase correspond à la dégradation des composés labiles; elle dure environ 20 jours. Des constantes de vitesse respectivement égales à 0,006 et 0,013 j<sup>-1</sup> ont été calculées dans les eaux de salinité 3 et 13. La constante calculée pour l'eau de salinité 13 est comparable à celles déterminées par Ogura (1975):  $0,01 < k < 0,09$  j<sup>-1</sup>, pour des eaux côtières (baie de Tokyo et de Sagami, Japon) dont les teneurs initiales en COD varient de 0,93 à 5,66 mg.l<sup>-1</sup>. Par contre, la constante déterminée pour l'eau de salinité 3 est

nettement plus faible que celles obtenues par Ogura (1975). La fraction dégradée au bout de 20 jours représente respectivement 8 et 15 % de la teneur initiale en matière organique dans les eaux de salinité 3 et 13. La matière organique se révèle donc essentiellement de nature peu dégradabile. Pour la seconde phase (dégradation des composés organiques résistants), des constantes de vitesse égales à 0,002 et 0,001 j<sup>-1</sup> ont été calculées respectivement dans les eaux de salinité 3 et 13. Ces valeurs sont comparables à celles données par Ogura (1975) pour la décomposition de la matière organique difficilement dégradabile (0,001-0,009 j<sup>-1</sup>). En fin d'expérience (56 jours) les taux de dégradation sont respectivement de 15 et 18 % dans les eaux de salinités 3 et 13.

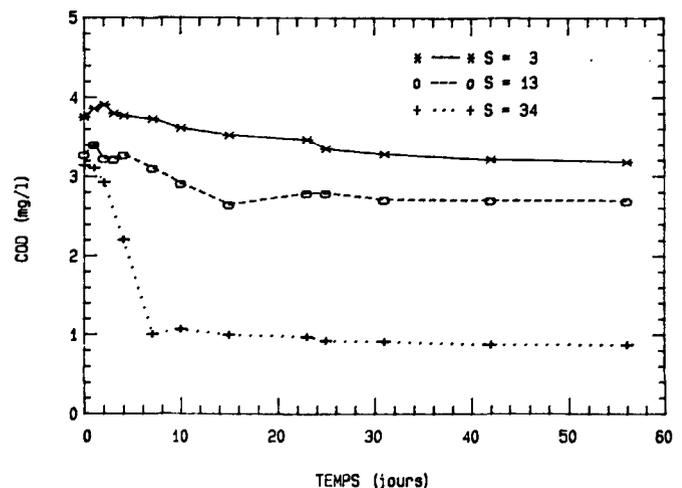


Figure 1

Variations du carbone organique dissout (COD) dans les eaux de salinité 3, 13 et 34 lors de l'incubation.

Variations of dissolved organic carbon (DOC) in waters of salinity 3, 13 and 34 during incubation.

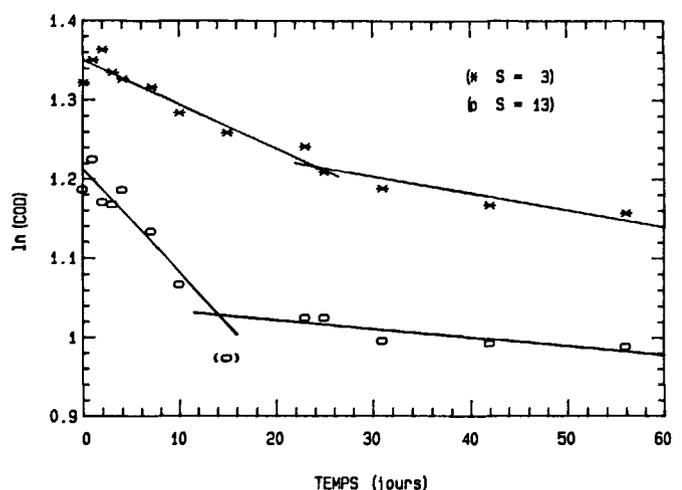


Figure 2

Variations de la concentration en COD, exprimée en coordonnées logarithmiques  $\ln(\text{COD})$ , dans les eaux de salinité 3 et 13.

Variations of DOC concentration, in logarithmic scale  $\ln(\text{DOC})$ , in seawaters of salinity 3 and 13.

### Variations des stérols

Les variations des concentrations en stérols totaux (fig. 3) montrent que la dégradation de ces composés

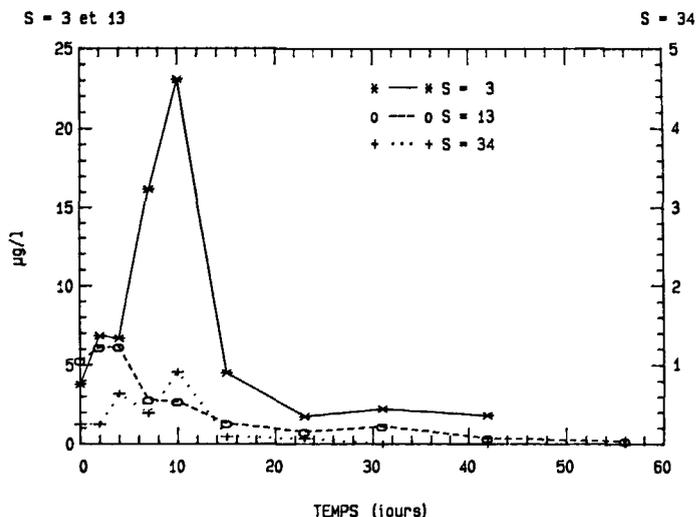


Figure 3  
Variations des stérols totaux (somme des concentrations individuelles des différents stérols) dans les eaux de salinité 3, 13 et 34 lors de l'incubation.  
*Variations of total sterols (sum of individual concentrations of the different sterols) in waters of salinity 3, 13 and 34 during incubation.*

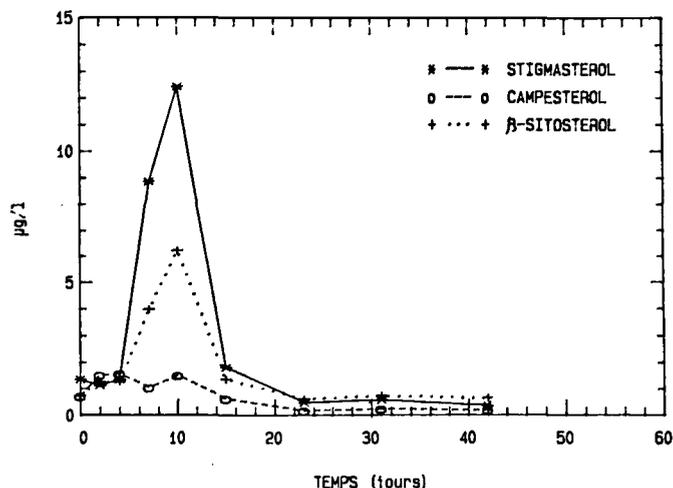


Figure 5  
Variations du stigmasterol, du campesterol et du β-sitostérol dans l'eau de salinité 3.  
*Stigmasterol, campesterol and β-sitosterol variations in water of salinity 3.*

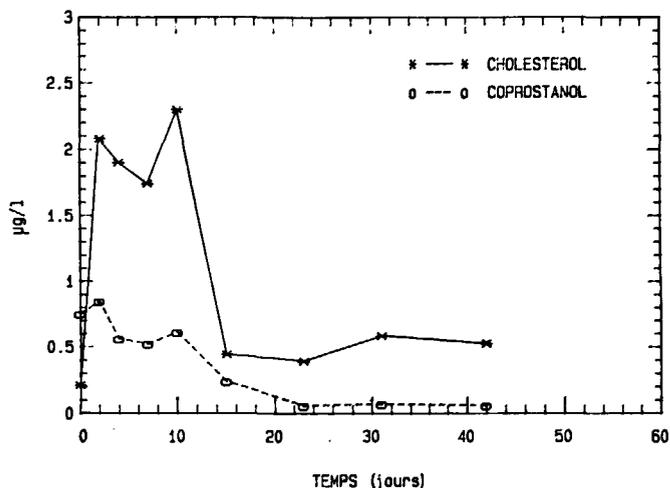


Figure 4  
Variations du cholestérol et du coprostanol dans l'eau de salinité 3.  
*Cholesterol and coprostanol variations in water of salinity 3.*

n'est pas un phénomène simple. Les stérols sont en effet formés au cours de la décomposition de la matière organique, lors des dix premiers jours d'incubation. Le phénomène est apparent dans les différentes eaux étudiées; il est particulièrement marqué dans l'eau de salinité 3. Au niveau des variations individuelles, les augmentations de concentration sont observées pour tous les stérols, mais à des degrés divers selon les composés. Dans l'eau de salinité 3, du cholestérol est rapidement formé au cours des deux premiers jours (fig. 4). Du β-sitostérol, et surtout du stigmasterol, sont formés en quantités importantes (respectivement 5 et 11 µg.l<sup>-1</sup>) du quatrième au dixième jour d'incubation (fig. 5). Les concentrations en coprostanol et en campesterol n'augmentent que faiblement. Dans les eaux de salinité 13 et 34, la quantité de chaque stérol formée est moins importante, puisqu'elle ne dépasse pas 0,8 µg.l<sup>-1</sup>, et la formation du stigmasterol n'est plus prédominante. Dans l'eau de salinité 34, les trois phy-

tostérols (campesterol, stigmasterol et β-sitostérol) ne sont pas détectés au départ de l'incubation : ils n'apparaissent qu'au quatrième jour. La formation des stérols a été également observée dans les différentes eaux filtrées à 1 µm avant l'incubation. A chaque salinité, les quantités formées dans l'eau non filtrée et dans l'eau filtrée sont du même ordre de grandeur. Dans le cas, par exemple, de l'eau de salinité 3 (fig. 6 et 7), la concentration maximale en stigmasterol mise en évidence dans l'eau filtrée (12,1 µg.l<sup>-1</sup>) est équivalente à celle observée dans l'eau non filtrée (12,4 µg.l<sup>-1</sup>); néanmoins, la formation du β-sitostérol est plus faible dans la première que dans la seconde.

Dans les différentes eaux, la dégradation des quantités de stérols formées est relativement rapide. Dans l'eau de salinité 3 non filtrée (fig. 4 et 5), du dixième au quinzième jour d'incubation, les taux de dégradation sont respectivement de 80, 86 et 78 % pour le cholestérol, le stigmasterol et le β-sitostérol. A partir du vingtième jour, période au bout de laquelle le COD labile a été dégradé, les concentrations des stérols dans les différentes eaux deviennent très faibles et ne varient plus de façon importante.

DISCUSSION

Nos résultats montrent que la dégradation de la matière organique n'est pas un phénomène simple. Les stérols, composés appartenant à la fraction labile, présentent des variations relativement complexes : dans toutes les eaux analysées, ils sont formés au cours des premiers jours de la dégradation de la matière organique. Quel processus est à l'origine de la formation des stérols? Il faut tout d'abord souligner qu'il est communément admis que ces composés ne sont pas synthétisés par les bactéries (O'Leary, 1970; Lechevalier, 1980). Par ailleurs, les augmentations de concentration observées ne peuvent être imputées à une simple désorption des

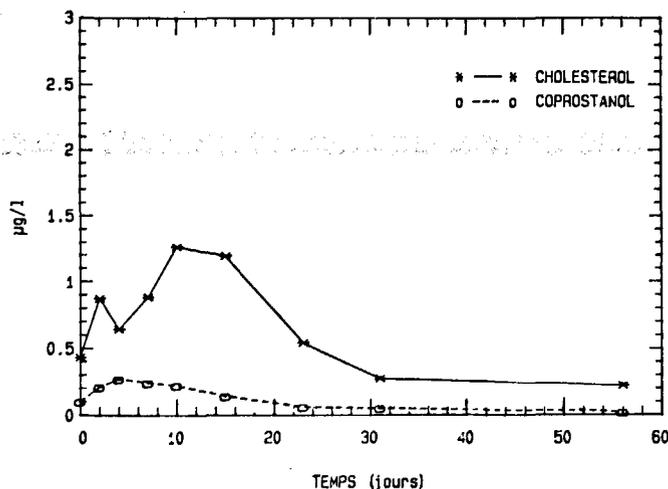


Figure 6

Variations du cholestérol et du coprostanol dans l'eau de salinité 3 filtrée à 1 µm avant l'incubation.

*Cholesterol and coprostanol variations in water of salinity 3 filtered at 1 µm before incubation.*

stérols à partir de matière particulaire, puisque les échantillons ont été extraits dans leur totalité sans filtration préalable lors de l'analyse. Les stérols ont pu initialement faire partie de composés organiques complexes non extractibles au chloroforme. La formation des stérols pourrait alors être due à la dégradation de ces composés complexes par les micro-organismes, notamment les bactéries. Il est généralement admis que les macromolécules ne sont pas assimilées directement par les bactéries, mais qu'elles subissent d'abord une hydrolyse exoenzymatique qui les transforme en substances à faible poids moléculaire (Kim et Hoppe, 1986). Lee *et al.* (1980) ont observé une formation de sitostérol et de stigmasterol lors de la décomposition d'une plante des marais, *Spartina alterniflora*. Une des hypothèses avancée par les auteurs est qu'il s'agit de l'hydrolyse par des champignons du matériel structural cellulaire de *Spartina alterniflora*, dans la composition duquel entrent des esters de stérols. Matsumoto (1983) a aussi constaté une augmentation de concentration en stigmasterol (environ  $6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) et en  $\beta$ -sitostérol (moins de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) au cours des trois premiers jours d'incubation, lors d'une expérience de dégradation menée sur une eau de rivière non filtrée. Cet auteur interprète ces augmentations de concentration comme une conséquence de la biodégradation de fragments de végétaux supérieurs, le stigmasterol et le  $\beta$ -sitostérol étant abondants dans ces organismes. Dans nos expériences, le processus de formation des stérols n'est pas limité aux seuls phytostérols, mais concerne également le cholestérol et, dans une moindre mesure, le coprostanol. Les composés organiques complexes de départ proviendraient donc, au moins en partie, d'autres sources que les végétaux supérieurs (organismes planctoniques, matériel d'origine anthropique, ...). Nous avons également observé le phénomène dans les différentes eaux initialement filtrées à 1 µm. Les quantités formées sont, pour chaque salinité, comparables dans l'eau non filtrée et dans l'eau filtrée. Aussi, dans l'hypothèse d'une dégradation de composés organiques com-

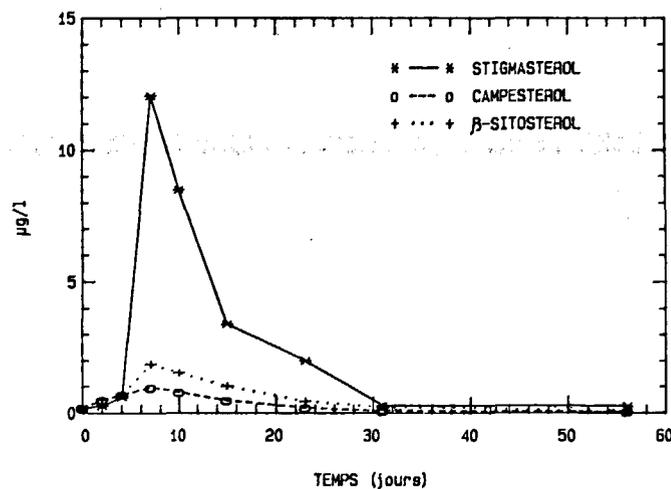


Figure 7

Variations du stigmasterol, du campesterol et du  $\beta$ -sitostérol dans l'eau de salinité 3 filtrée à 1 µm avant l'incubation.

*Stigmasterol, campesterol and  $\beta$ -sitosterol variations in water of salinity 3 filtered at 1 µm before incubation.*

plexes, ceux-ci ne peuvent qu'être sous forme dissoute ou sous forme micro-particulaire de taille inférieure à 1 µm. La quantité de stérols formée augmente quand la salinité diminue (fig. 3); elle est particulièrement importante dans l'eau de faible salinité. Ceci peut correspondre à la présence dans les eaux dessalées de teneurs élevées en substances organiques dissoutes complexes.

Les augmentations de concentrations des stérols peuvent aussi avoir pour origine le développement de certains organismes autres que les bactéries. Le fait que la formation des stérols soit observée dans les eaux filtrées implique que les organismes considérés doivent avoir, au moins au départ de l'incubation, une taille inférieure ou égale à 1 µm. Il est ainsi peu probable que ces organismes soient de type phytoplanctonique. Il pourrait s'agir d'organismes tels que des champignons ou des moisissures. Cependant, dans les différentes eaux, nous n'avons pas identifié d'ergostérol (méthyl-24 cholestatriène-5-7-22 ol-3 $\beta$ ) qui est généralement synthétisé par ces organismes. Les phycomycètes aquatiques font néanmoins exception et, à la place de l'ergostérol, synthétisent des composés en C27, C28 et C29 (Weete, 1973). La composition détaillée en stérols des organismes de ce type qui vivent en milieu marin est néanmoins peu connue. D'autres types d'organismes, tels les microflagellés bactériovores, peuvent aussi être responsables de la formation des stérols. Certains de ces organismes ont une taille voisine de 1 µm (Rassoulzadegan et Sheldon, 1986) et ils ont pu ne pas être entièrement éliminés lors de la filtration. Dans cette hypothèse, l'importante formation de stérols dans l'eau de salinité 3 serait liée à un fort développement de micro-organismes.

Le coprostanol a été formé, en faibles quantités, dans l'eau de salinité 3 (et aussi dans celle de salinité 13), au cours des premiers jours de l'incubation. La concentration du coprostanol peut donc augmenter dans le milieu par le biais d'un processus biologique. Ce type

de résultats a été également obtenu par Pocklington *et al.* (1987), lors d'un travail sur la matière organique particulaire dans le bassin de Bedford (Nouvelle-Écosse, Canada). Ces auteurs ont mis en évidence que, pendant l'été, les augmentations de concentration en coprostanol sont concomitantes de celles de composés non-anthropogènes, notamment les phytostérols. Ils suggèrent que la formation estivale du coprostanol est liée à la production primaire. Cependant, le coprostanol n'est généralement pas considéré comme un stérol synthétisé par les organismes inférieurs (pour une revue à ce sujet, voir Walker *et al.*, 1982) et, dans notre cas, l'hypothèse la plus probable semble une origine liée à la décomposition de molécules organiques complexes.

## CONCLUSION

La dégradation de la MOD dans les eaux estuariennes, sur une période de deux mois, peut se décrire par une succession de deux cinétiques du premier ordre. Elle est nettement plus rapide au cours de la première phase, qui dure 2 à 3 semaines à 20°C ( $k = 0,006$  à  $0,013 \text{ j}^{-1}$ ), que pendant la seconde phase ( $k = 0,001$  à  $0,002 \text{ j}^{-1}$ ). L'examen détaillé de l'évolution des stérols (cholestérol,

coprostanol, campestérol, stigmastérol et  $\beta$ -sitostérol) met en évidence l'existence de phénomènes complexes se traduisant par l'augmentation, au cours des dix premiers jours, des concentrations de ces composés dans tous les types d'eaux étudiés. Les stérols sont ensuite dégradés relativement rapidement. Pour expliquer la formation des stérols, deux hypothèses sont avancées :

- hydrolyse enzymatique de composés organiques complexes préexistants ;
- synthèse de stérols par des micro-organismes autres que des bactéries.

Les variations de ces composés spécifiques, importantes pour la connaissance de la matière organique en milieu marin, doivent faire l'objet d'études complémentaires permettant de tester ces hypothèses : séparation dissous-particulaire, identification des micro-organismes.

## Remerciements

Ce travail a été mené dans le cadre du programme « Rejets Urbains » de l'IFREMER. Nous remercions R. Kérouel pour les mesures des paramètres hydrologiques et du carbone organique dissous.

## RÉFÉRENCES

- Aminot A., R. Kérouel, G. Thoumelin, Y. Marty et P. Le Corre (1986). Laboratory study of degradation of natural organic matter and waste water organic matter in sea waters of different salinities. *Proceedings of the International Conference on Chemicals in the Environment, Lisbon 1-3 July 1986*, J.N. Lester, R. Perry and R. M. Sterrit, éditeurs, Selper Ltd., London, 443-451.
- Bada J. L. et C. Lee (1977). Decomposition and alteration of organic compounds dissolved in seawater. *Mar. Chem.*, **5**, 523-534.
- Barber R. T. (1968). Dissolved organic carbon from deep waters resists microbial oxidation. *Nature*, **220**, 274-275.
- Barbier M., D. Tusseau, J.-C. Marty et A. Saliot (1981). Sterols in aerosols, surface microlayer and subsurface water in the North-Eastern Tropical Atlantic. *Oceanologica Acta*, **4**, 1, 77-84.
- Chapman D., T.C.M. Kramers et C. J. Restall (1985). Cholesterol and biomembranes structure. in: *Sterols and bile acids*, M. Danielsson and J. Sjövall, éditeurs, Elsevier, Amsterdam, 151-174.
- Delmas R. (1981). Étude de l'évolution saisonnière des sels nutritifs dans la rade de Brest en fonction des apports fluviaux et des échanges avec l'Iroise. *Thèse Doctorat de spécialité, Université de Bretagne Occidentale, Brest*, 163 pp.
- El Sayed M. A. (1988). Contribution à l'étude du comportement géochimique de quelques métaux traces (cuivre, fer, manganèse et zinc) et de la matière organique dans le milieu estuarien. Cas de l'estuaire de la Loire et de la rade de Brest. *Thèse Doctorat d'État, Université de Bretagne Occidentale, Brest*, 472 pp.
- Gagosian R. B. (1975). Sterols in the western North Atlantic ocean. *Geochim. cosmochim. Acta*, **39**, 1443-1454.
- Gagosian R. B. (1976). A detailed vertical profile of sterols in the Sargasso Sea. *Limnol. Oceanogr.*, **21**, 702-710.
- Gagosian R. B. et G. E. Nigrelli (1979). The transport and budget of sterols in the western North Atlantic Ocean. *Limnol. Oceanogr.*, **24**, 838-849.
- Gagosian R. B., S. O. Smith et G. E. Nigrelli (1982). Vertical transport of steroid alcohols and ketones measured in a sediment trap experiment in the equatorial Atlantic Ocean. *Geochim. cosmochim. Acta*, **46**, 1163-1172.
- Goad L. J. (1978). The sterols of marine invertebrates: composition, biosynthesis and metabolites. in: *Marine Natural Products, Vol. 2*, P. J. Scheuer, éditeur, Academic Press, 75-122.
- Goodwin T. W. (1985). Biosynthesis of plant sterols. in: *Sterols and Bile Acids*, M. Danielsson and J. Sjövall, éditeurs, Elsevier, Amsterdam, 151-198.
- Hennion M. C., J.-C. Thiebemont, R. Rosset, P. Scribe, J.-C. Marty et A. Saliot (1983). Rapid semi preparative class preparation of organic compounds from marine lipid extracts by high-performance liquid chromatography and subsequent quantitative analysis by gas chromatography. *J. Chromatog.*, **280**, 351-362.
- Kanazawa A. et S. Teshima (1971). Sterols of the suspended matters in seawater. *J. oceanogr. Soc. Japan*, **27**, 207-212.
- Kim S. J. et H. G. Hoppe (1986). Microbial extracellular enzyme detection on agar plates by means of fluorogenic methylumbelliferyl-substrates. in: *2<sup>e</sup> colloque international de bactériologie marine, Brest, 1-5 Octobre 1984*, GERBAM (Groupe d'Étude et de Recherche en Bactériologie Marine), CNRS, IFREMER, Actes de colloques, **3**, 175-183.
- Lechevalier M. P. (1980). Lipids in bacterial taxonomy. in: *CRC Handbook of Microbiology*, A. I. Laskin et H. A. Lechevalier, éditeurs, 2nd edition, 435-541.
- Lee C., R. W. Howarth et B. L. Howes (1980). Sterols in decomposing *Spartina alterniflora* and the use of ergosterol in estimating the contribution of fungi to detrital nitrogen. *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 290-303.
- Lorenzen C. J. (1967). Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, **12**, 343-346.

- MacKinnon M. D. (1981). The measurement of organic carbon in seawater. in: *Marine organic chemistry*, E.K. Duursma and R. Dawson, éditeurs, Elsevier, Amsterdam, 415-443.
- Matsumoto G. (1983). Changes in organic constituents in river water during incubation. *Wat. Res.*, **17**, 1803-1810.
- Menzel D. W. (1970). The role of *in situ* decomposition of organic matter on the concentration of non-conservative properties in the sea. *Deep-Sea Res.*, **17**, 751-764.
- Menzel D. W. et J. H. Ryther (1968). Organic carbon and the oxygen minimum in the South Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res.*, **15**, 327-337.
- Meybeck M. (1982). Carbon, nitrogen and phosphorus transport by world rivers, *Am. J. Sci.*, **282**, 401-450.
- Ogura N. (1970). The relation between dissolved organic carbon and apparent oxygen utilization in the western North Pacific. *Deep-Sea Res.*, **17**, 221-231.
- Ogura N. (1972). Rate and extent of decomposition of dissolved organic matter in surface seawater. *Mar. Biol.*, **13**, 89-93.
- Ogura N. (1975). Further studies on decomposition on dissolved organic matter in coastal seawater. *Mar. Biol.*, **31**, 101-111.
- O'Leary W. M. (1970). Bacterial lipid metabolism. in: *Comprehensive Biochemistry*, M. Florkin et E. M. Stotz, éditeurs, Elsevier, Amsterdam, 18, 229-264.
- Patterson G. W. (1971). The distribution of sterols in algae. *Lipids*, **6**, 120-127.
- Pocklington R., J. D. Leonard et N. F. Crewe (1987). Le coprostanol comme indicateur de la contamination fécale dans l'eau de mer et les sédiments marins. *Oceanologica Acta*, **10**, 83-89.
- Rassoulzadegan F. et R. W. Sheldon (1986). Predator-prey interactions of nanozooplankton and bacteria in an oligotrophic marine environment. *Limnol. Oceanogr.*, **31**, 1010-1021.
- Romankevich E. A. (1984). *Geochemistry of Organic Matter in the Marine Ocean*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 334 pp.
- Saliot A. (1975). Acides gras, stérols et hydrocarbures en milieu marin : inventaire, applications géochimiques et biologiques. *Thèse Doctorat d'État, Université Pierre-et-Marie-Curie, Paris*, 167 pp.
- Saliot A. et M. Barbier (1973). Sterols from seawater. *Deep-Sea Res.*, **20**, 1077-1082.
- Saliot A., M. Goutx, A. Février, D. Tusseau et C. Andrié (1982). Organic sedimentation in the water column in the Arabian Sea: relationship between the lipid composition of small and large-size, surface and deep particles. *Mar. Chem.*, **11**, 257-278.
- Senior G. W. J. (1986). Étude de la matière organique dans l'estuaire de l'Élorn, Brest, France. Les carbohydrates. *Thèse Doctorat de spécialité, Université de Bretagne Occidentale, Brest*, 158 pp.
- Scheuer P. J. (1973). *Chemistry of Marine Natural Products*. Academic Press, New York, London, 201 pp.
- Schreurs W. (1978). An automatic colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in sea water by UV destruction. *Hydrobiol. Bull.*, **12**, 137-142.
- Skopintsev B. A. (1981). Decomposition of organic matter of plankton, humification and hydrolysis. in: *Marine Organic Chemistry*, E.K. Duursma et R. Dawson, éditeurs, Elsevier, Amsterdam, 125-177.
- Thoumelin G. (1988). Décomposition de la matière organique dans les eaux de mer côtières ; étude en laboratoire de la biodégradation d'effluents urbains. *Thèse Doctorat de spécialité, Université de Bretagne Occidentale, Brest*, 181 pp.
- Tusseau D. (1980). Les stérols en milieu marin. *Thèse Doctorat de spécialité, Université Pierre-et-Marie-Curie, Paris*, 108 pp.
- Tusseau D., M. Barbier et A. Saliot (1978). Inventaire et dynamique des lipides à l'interface eau de mer-sédiment. III : Stérols de l'eau de mer et de l'eau interstitielle. in: *Géochimie organique des sédiments marins profonds. Orgon II. Atlantique, Nord-Est Brésil*, A. Combaz et R. Pelet, éditeurs, CNRS, Paris, 253-261.
- Volkman J. K. (1986). A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter. *Org. Geochem.*, **9**, 83-99.
- Wakeham S. G. et E. A. Canuel (1988). Organic geochemistry of particulate matter in the eastern tropical North Pacific Ocean : implications for particle dynamics. *J. mar. Res.*, **46**, 183-213.
- Walker R. W., C. K. Wun et W. Listky (1982). Coprostanol as an indicator of fecal pollution. *CRC critical Rev. environ. Control*, **10**, 91-112.
- Weete J. D. (1973). Sterols of the fungi: distribution and biosynthesis. *Phytochemistry*, **12**, 1843-1864.