

EVOLUTION DES CARACTERISTIQUES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES  
DES SEDIMENTS MARINS EN CIRCUIT CLOS

IV : Régulation du nitrite en présence de crevettes  
Penaeus japonicus

par  
GENEVIEVE MEVEL

avec la collaboration technique de Claudette FAIDY  
Centre d'Etude d'Océanographie et de Biologie  
Marine du CNRS 29211 ROSCOFF

RESUME

Des Pénéides (Penaeus japonicus) ont été élevées pendant plus de neuf mois dans des bacs expérimentaux fonctionnant en circuit clos. Dans de tels écosystèmes, l'apparition du nitrite est liée d'une part au déroulement normal de la nitrification et d'autre part à une déficience en oxygène du milieu. A partir d'un certain taux, ce nitrite provoque la mortalité des crevettes. La concentration d'oxygène dissous et, par la même, le taux de nitrite présent dans l'eau, apparaît donc comme étant le facteur principal du bon développement des crevettes dans des bacs fonctionnant en circuit clos. Dans ces conditions d'élevage, la vitesse de croissance des crevettes est relativement basse : la prise de poids individuel est de 9 g en 7 mois. Par contre la charge atteinte est assez importante pour un tel système d'élevage, elle est de l'ordre de 600 g de crevettes /m<sup>2</sup>.

ABSTRACT : Chemical and biological evolution of sediments in closed circuit.  
IV Nitrite regulation

Prawns (Penaeus japonicus) were rearing during more than nine months in experimental closed circuit tanks. In such systems the nitrite appearance is related to the normal nitrification process and to oxygen deficiency. Above a given level, nitrite causes the death of prawns. The soluble oxygen concentration and, thus, nitrite level in the water appears as the main factor for a successful development of prawns in closed circuit tanks. In these conditions, the growth rate of the prawns is relatively low (9g/per individual in seven months). Nevertheless, such a system allows a load of some 600 g prawns per m<sup>2</sup>.

MOTS - CLES : Circuit clos - Nitrification - Peneide .

KEY - WORDS : Closed circuit - Nitrification - Peneide.

## INTRODUCTION

Le principal intérêt d'un circuit clos est de fournir un environnement connu et dont les variations ne sont pas aléatoires. Cette exigence est fondamentale pour maintenir en bonnes conditions les animaux qui y sont élevés. Cependant, bien qu'étant à l'abri de telles variations (saisonniers par exemple), la qualité de l'eau de mer confinée dans des bacs en circuit fermé doit être suivie de près. En effet, dans toutes les installations en circuit clos, il y a accumulation de déchets azotés qui perturbent le milieu. Cette accumulation démarre avec l'augmentation du taux d'ammoniac, hautement toxique sous forme non-ionisée. Ensuite, résultant de la nitrification, les nitrites puis les nitrates apparaissent.

Des Pénéides (Penaeus japonicus) sont maintenues pendant près d'un an dans des bacs expérimentaux afin de déterminer les différents facteurs qui conditionnent l'élevage d'animaux marins dans de tels écosystèmes. Pendant toute cette période l'évolution chimique du milieu ainsi que la croissance et la mortalité des crevettes ont été suivies.

### 1 - MATERIEL ET METHODES

#### 1.1. Les bacs expérimentaux

Les bacs utilisés pour cette étude sont construits sur le même modèle que ceux utilisés par G. BOUCHER et S. CHAMROUX (1976).

Il s'agit de bac à double fond, contenant du sable placé en percolation et fonctionnant en circuit fermé. L'agencement de ces bacs, comportant trois compartiments, permet de régler la quantité d'eau qui traverse le sédiment.

La présence de Pénéides dans ces écosystèmes implique certaines exigences : grand volume d'eau, température, salinité. Tous les facteurs caractérisant les bacs sont résumés dans le tableau 1.

Le bac 1 sert de bac témoin. Pour entretenir les populations bactériennes, il est enrichi quotidiennement par 15 ml d'une solution d'hydrolysate de caséine (casamino-acid Difco) à 10%, ce qui correspond à 1370 g de casamino-acid / an / m<sup>2</sup> soit 110 g d'azote organique / an / m<sup>2</sup>.

Les crevettes sont introduites dans les bacs 2 et 3 à la sixième semaine. Avant cela, pendant le temps de stabilisation, ces deux bacs sont nourris comme le bac 1. Ensuite ils reçoivent, comme nourriture pour les crevettes, 5 g de granulé par jour c'est à dire 3% du poids de crevettes. Au cours de l'expérience, cette quantité journalière augmente parallèlement à la prise de poids des animaux de façon à être toujours égale à 3% de la charge.

#### 1.2. Etude chimique du milieu

Sur un même échantillon sont dosées successivement toutes les formes azotées : NH<sub>4</sub> . NO<sub>2</sub> + NO<sub>3</sub> et l'azote organique (S.CHAMROUX et G. BOUCHER, 1978. 1 )

CARACTERISTIQUES DES BACS

		Bac 1	Bac 2	Bac 3
<u>Eau</u>	Température (°C)	20	20	20
	Salinité (%)	35	35	35
	Volume (litres)	490	510	433
	Dénivellation A/B (cm)	1	1	1
	Débit d'eau (litres/h/m <sup>2</sup> )	150	120	210
	Vitesse de filtration (cm/mm)	0,26	0,20	0,35
	<u>Sable</u>	Surface (m <sup>2</sup> )	0,4	0,4
Epaisseur (cm)		20	20	20
Granulométrie (μ)		500	500	160 et 1600
<u>Apport de matière organique</u>	Casamino-acid à 10%	15 ml	-	-
	Granulé	-	3% de la charge	3% de la charge
<u>Charge en crevettes</u>	<u>1er lot:</u> - poids moyen = 14,5g - taille moyenne = 3,2 cm	-	10	10
	<u>2ème lot:</u> - poids moyen 1,01 g - taille moyenne 1,2 cm	-	30	30
	Charge (g/m <sup>2</sup> ) au temps 0	-	438	413

Tableau 1

1.3. Consommation d'oxygène par le sédiment

L'oxygène dissous est mesuré dans l'eau des bacs par la méthode de WINKLER. Ces mesures sont faites dans l'eau surnageante et à la sortie du sédiment. La différence entre les concentrations d'oxygène mesurées au-dessus puis à la sortie du sable, permet d'évaluer la consommation d'oxygène par le sédiment.

1.4. Elevage des crevettes

La nourriture est distribuée le soir . Chaque matin : les bacs sont débarassés des fèces et des déchets de nourriture ; la mortalité est notée; les exuvies sont prélevées et mesurées.

Les mesures de taille sont faites sur le céphalothorax : du fond de l'échancrure orbitaire à l'extrémité postérieure . Une courbe d'allométrie

reliant cette mesure au poids de l'animal , a été établie au début de l'expérience . Ainsi, à chaque fois que l'on atteint 100% mues, la moyenne de taille des exuvies est calculée et le poids individuel moyen est déduit de la courbe. Par suite, la charge totale en crevettes est estimée.

## 2- RESULTATS

### 1. Evolution des sels azotés dans l'eau des bacs

Des dosages d'azote ammoniacal, de nitrite et de nitrate sont faits régulièrement dans les trois bacs expérimentaux. Durant les neuf mois d'expérience, ni  $\text{NH}_3$  ni  $\text{NO}_2$  n'apparaissent dans l'eau du bac témoin. Seul le nitrate est présent . Par contre, dans l'eau des deux bacs d'élevage (bacs 2 et 3), on note l'apparition successive des différentes formes minérales de l'azote. Dès l'introduction des crevettes dans le milieu l'azote ammoniacal apparaît. Il atteint un maximum (242 et 70  $\mu\text{atg N.NH}_4$  / litre respectivement dans le bac 2 et le bac 3) puis disparaît après six semaines. Pendant la diminution de l'ammoniaque, le nitrite augmente, atteint un niveau légèrement supérieur à l'azote ammoniacal (609  $\mu\text{atg N. NO}_2$  / litre dans le bac 2 et 138  $\mu\text{atg N.NO}_2$  / litre dans le bac 3 ). Après six à sept semaines, ils s'annulent également. Ensuite, les nitrates apparaissent mais ne s'annulent pas. Ces observations correspondent au schéma classique de la nitrification en circuit clos. Ceci a été décrit par SPOTTE et KING (1970).

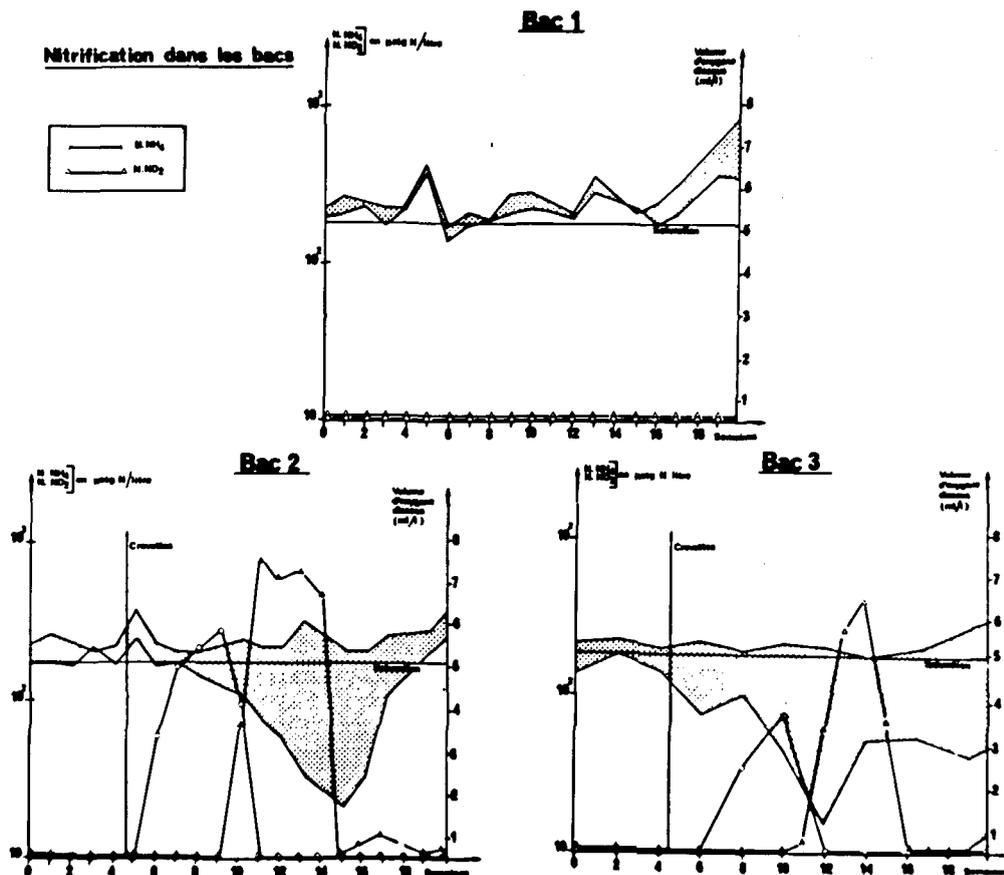


Figure 1 : Production de nitrite par nitrification dans les bacs expérimentaux. Elle se déroule quand l'oxygène est à saturation. Le grisé correspond à la consommation d'oxygène par le sédiment. Il est limité à la partie supérieure par la concentration d'oxygène dans l'eau surnageante et par cette concentration dans l'eau sortant du sable.

La consommation d'oxygène par le sédiment est de l'ordre de 0,5 ml/litre dans le bac 1 ainsi que dans les bacs 2 et 3 au début de l'expérience. Parallèlement au déroulement de la nitrification, la consommation d'oxygène augmente dans les bacs d'élevage. Elle atteint 3,62 ml/litre dans le bac 2 et 4,13 ml/litre dans le bac 3.

Plus tard des pics de nitrite apparaissent à nouveau dans l'eau d'élevage. Dans le bac 3, au cours du 5ème et du 6ème mois, deux pics de nitrites de faible intensité atteignent respectivement 15 et 60  $\mu\text{atg N-NO}_2/\text{litre}$ . Dans le bac 2, cette 2ème augmentation du nitrite est plus importante. Elle s'étend du 6ème au 8ème mois et atteint 200  $\mu\text{atg N-NO}_2/\text{litre}$ . Dans tous les cas, la présence du nitrite correspond à une déficience en oxygène et à une chute de nitrate qui est réduit en nitrite.

Quand le taux d'oxygène remonte, le phénomène inverse se produit. Pour pallier à ces chutes d'oxygène et, par la même, à ces pics de nitrites, une oxygénation intense est réalisée dans les bacs par apport supplémentaire d'air comprimé.

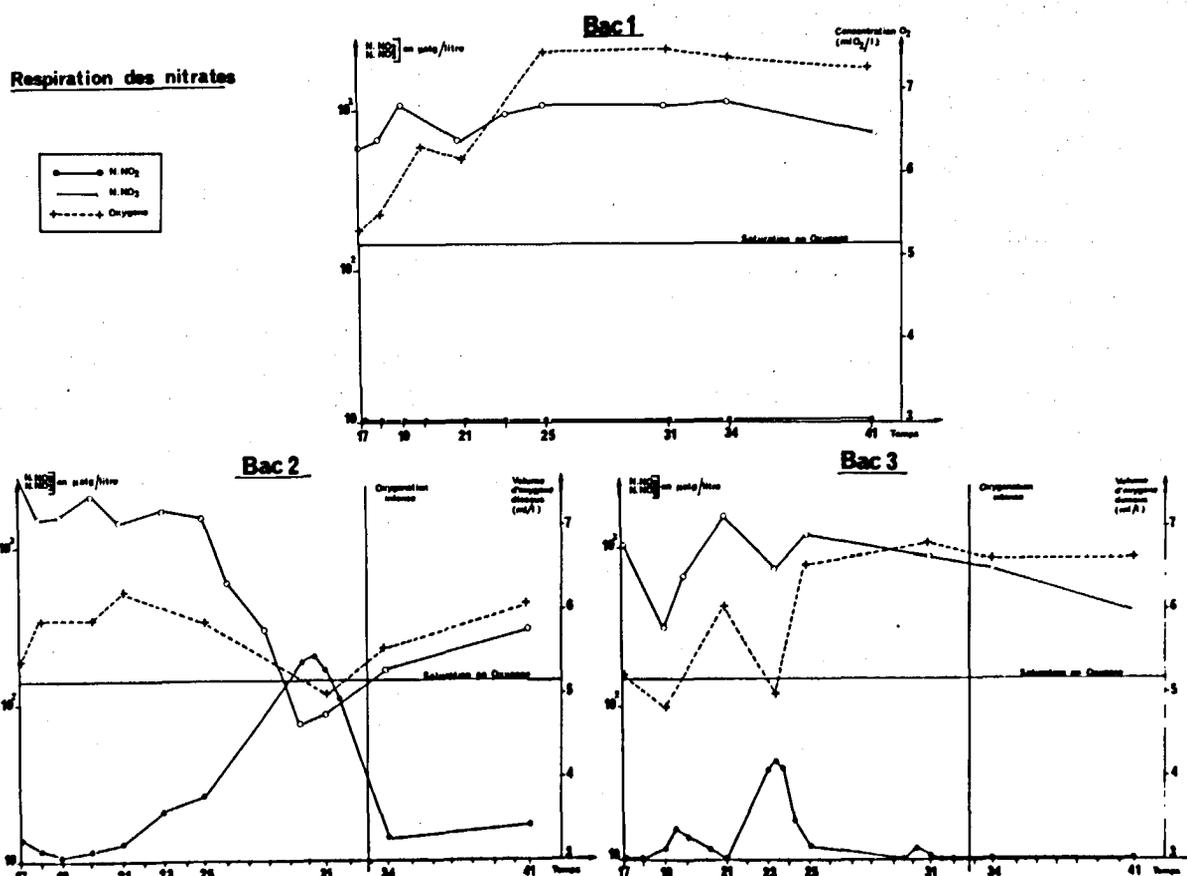


Figure 2 : Production de nitrite par respiration bactérienne du nitrate. Elle est provoquée par la déficience en oxygène du milieu.

Les observations faites dans les bacs montrent donc que l'apparition du nitrite dans le milieu peut être liée soit au déroulement normal de la nitrification soit à une respiration bactérienne du nitrate. Ces deux métabolismes inverses sont eux-même étroitement liés aux conditions d'oxygénation du milieu: le premier exige une forte concentration d'oxygène dissous et le deuxième n'intervient que lors d'une baisse d'oxygène dans le milieu.

## 2. Métabolisme du nitrite: Etude expérimentale

Pour mettre en évidence les facteurs qui régissent la production de nitrite, des échantillons d'eau et de sable venant des trois bacs expérimentaux sont mis en incubation dans des flacons pour culture aérobie. Ces fioles contiennent des milieux de culture spécifiques à la nitrification.

### - Milieu autotrophe, inspiré des milieux de CAREY (1936) :

Eau de mer artificielle	1000 ml
Solution d'oligo éléments	10 gouttes
CaCl <sub>2</sub> à 10%	10 ml
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> à 10%	1 ml
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 mg
K <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>	100 mg
CaCO <sub>3</sub>	3 g

### - Milieu hétérotrophe (LAURENT, 1972) :

Eau de mer artificielle	1000 ml
Solution d'oligo éléments	10 gouttes
CaCl <sub>2</sub> à 10%	10 ml
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> à 10%	1 ml
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 mg
CaCO <sub>3</sub>	3 g
Casamino acid (Difco)	1 g
Yeast extract (Difco)	0,5 g

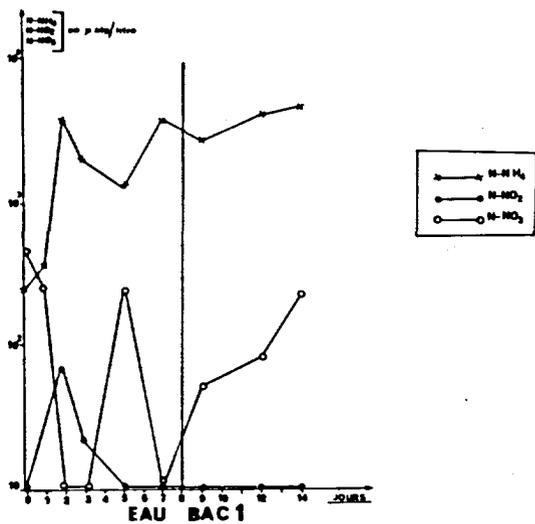
### - Milieu succinate

Eau de mer artificielle	1000 ml
Solution d'oligo éléments	10 gouttes
CaCl <sub>2</sub> à 10%	10 ml
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> à 10%	1 ml
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 mg
K <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>	100 mg
CaCO <sub>3</sub>	3 g
Succinate	2 g

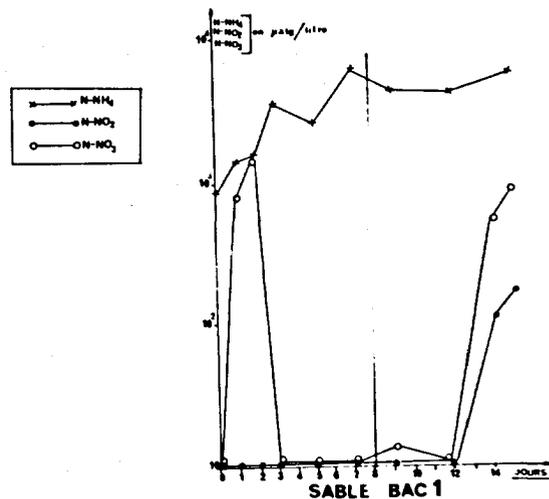
Dans tous les cas, 50 ml d'eau ou 50 g de sable (poids sec) sont inoculés à un litre de milieu de culture. L'incubation faite à 16° C, dure cinq à quinze jours selon la vitesse de réaction. La cinétique des phénomènes étudiés est suivie par dosages des sels azotés.

Une première série de fioles expérimentales, contenant un milieu hétérotrophe et étantensemencée par de l'eau originaire des trois bacs, est laissée au repos pendant la première semaine d'incubation. Dans les trois cas, on note sur les graphiques dès les premières jours, une apparition de nitrite corrélative à la chute du nitrate. Le nitrite s'annule et l'azote ammoniacal ne cesse d'augmenter. NO<sub>2</sub> et NH<sub>3</sub> semblent produits par la réduction du nitrate. Au huitième jour d'expérience, une agitation intense et permanente des fioles est réalisée. Elle provoque une augmentation rapide du nitrate. Ce sel représentant la forme azotée la plus oxydée ne peut être que le résultat d'une nitrification.

INCUBATIONS NON AGITEES



INFLUENCE de L'AGITATION sur la NITRIFICATION



63

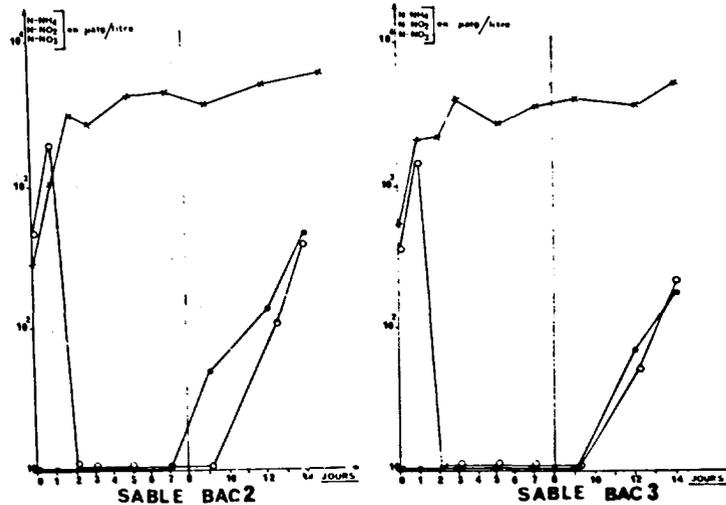
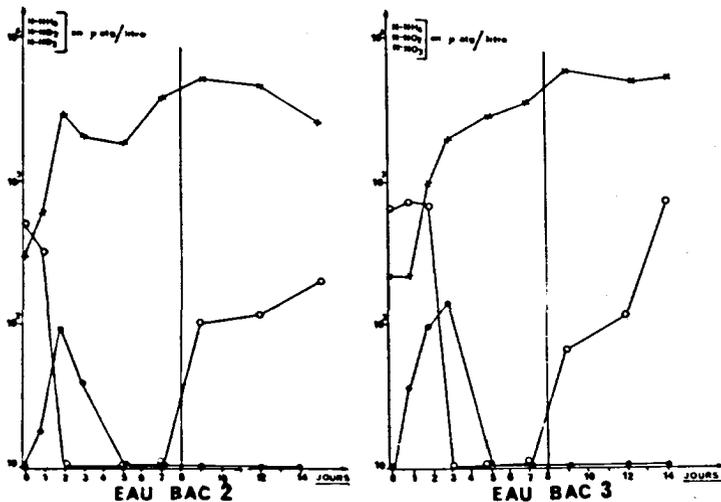


Figure 3 : En conditions d'anaérobie, du nitrite est produit dans un milieu de culture hétérotrophe, inoculé par l'eau des bacs. L'agitation au temps 8, provoque une nitrification.

Figure 4 : Dans ces mêmes conditions, du sable est inoculé. Le manque d'oxygène provoque un arrêt de la nitrification au 8ème jour, l'aération du milieu entraîne une nitrification intense avec production de nitrite.

Une deuxième série de fioles, incubées strictement dans les mêmes conditions que ci-dessus, est inoculée par le sable des bacs. La chute du nitrate qui survient dès le deuxième jour montre que la nitrification ne peut avoir lieu dans un milieu déficient en oxygène. Ici, pendant la phase non agitée, le nitrite n'apparaît pas mais l'ammoniaque augmente : Le nitrate pourrait être réduit en  $\text{NH}_4$ . Dès l'agitation des fioles, nitrite et nitrate réapparaissent dans le milieu de culture.

### INCUBATIONS AGITEES

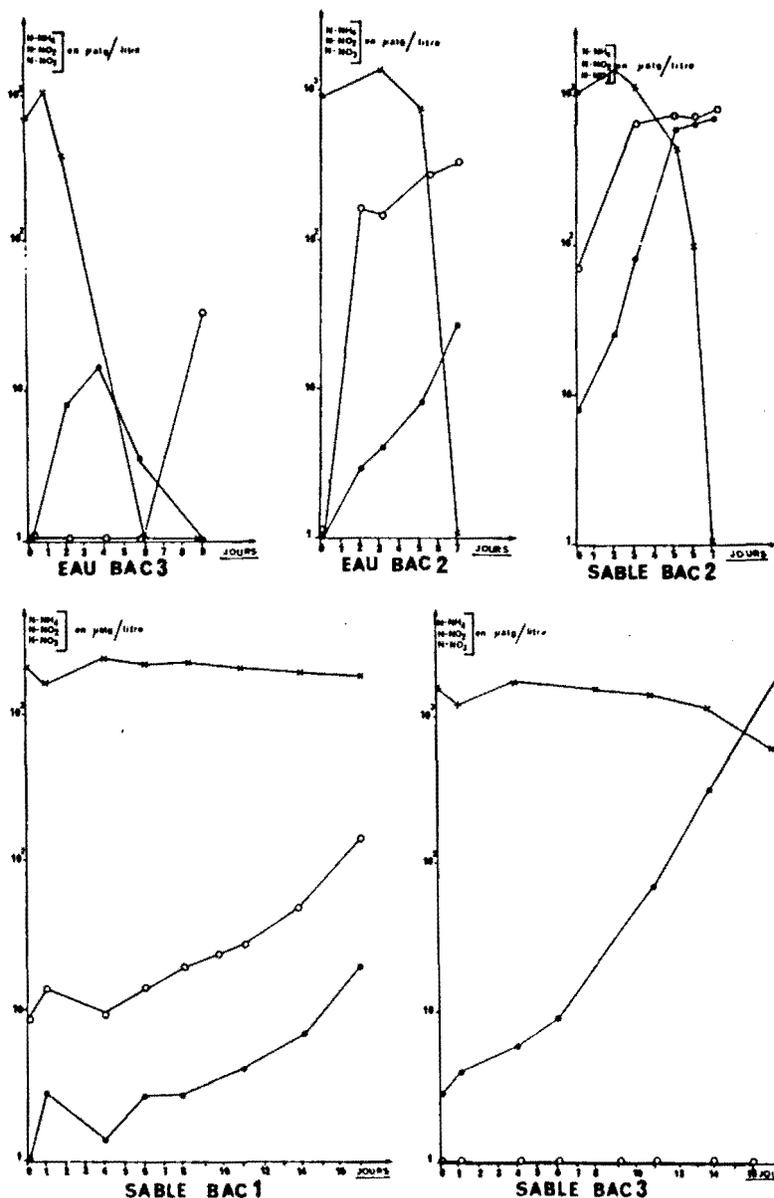


Figure 5 : Des échantillons d'eau et de sable inoculés dans différents milieux de culture subissant une oxygénation intense, produisent une forte nitrification.

Une troisième série d'incubations caractérisée par une agitation permanente du milieu, est étudiée. Ici, dans tous les cas, qu'il s'agisse d'eau ou de sable de milieu succinate, hétérotrophe ou autotrophe :  $\text{NO}_2$  et  $\text{NO}_3$ , apparaissent. Les phénomènes sont plus ou moins intenses et plus ou moins rapides mais dans tous les cas, il s'agit d'une production de nitrites par nitrification. En effet corrélativement à cette production d'azote oxydé, l'azote ammoniacal chute:

$\text{NH}_3$  est oxydé en  $\text{NO}_2$  et  $\text{NO}_3$ . Ceci est possible grâce au brassage permanent du milieu qui permet l'oxygénation nécessaire à ce métabolisme.

Ces études expérimentales confirment bien les observations faites dans les bacs. Le nitrite est le point de rencontre de deux métabolismes inverses : ils sont produits lors de la nitrification qui ne se déroule qu'en présence d'oxygène et dès que l'oxygène est en quantité insuffisante dans le milieu, le nitrate présent utilisé par les bactéries comme substrat respiratoire est réduit en nitrite.

### 3. Conséquences sur les crevettes

La figure 6, illustrant le rythme de mue des Pénéides, montre bien que l'élevage de ces animaux est possible dans des circuits clos.

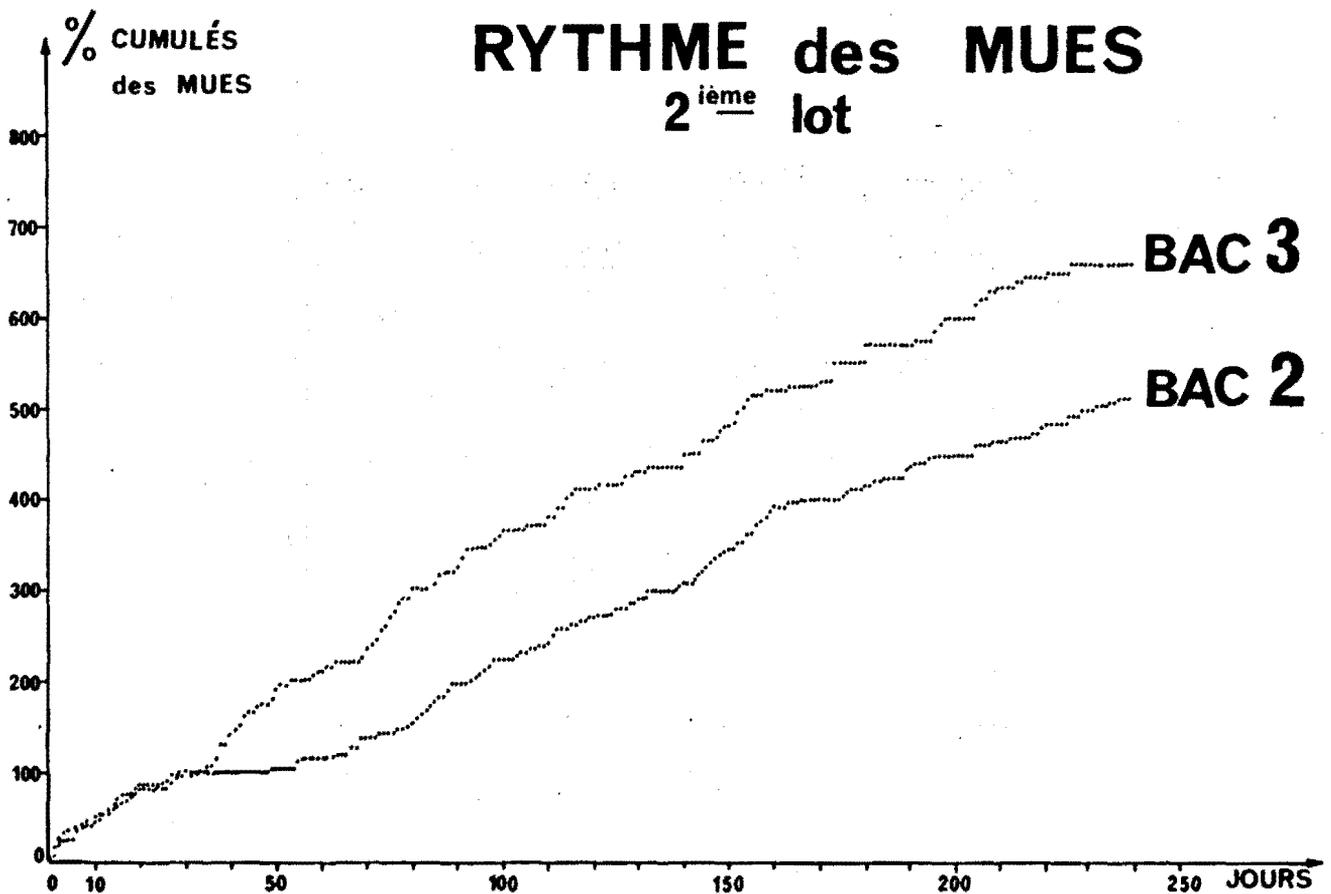


Figure 6 : Le rythme des mues dans les bacs montre bien qu'un tel élevage est possible. Cependant le taux de croissance y est relativement lent (5 à 7 mues en 8 mois).

Dans de telles conditions, le taux de croissance est plus faible que ceux observés dans des élevages en circuit ouvert. (prise de poids individuelle de 9g en 7 mois).

Cependant, si la croissance est lente, il faut noter que des charges importantes ont été atteintes. Dans le bac 2 elle est actuellement proche de 600 g/m<sup>2</sup>. Au 6ème mois d'expérience, cette charge a été dépassée dans le bac 3. Malheureusement à cette époque une panne de pompe a provoqué en une nuit une forte mortalité dans ce bac.

Dans les deux bacs d'élevage, la mortalité survient exactement au moment des augmentations de nitrite dans l'eau.

### Influence du nitrite sur la mortalité des crevettes

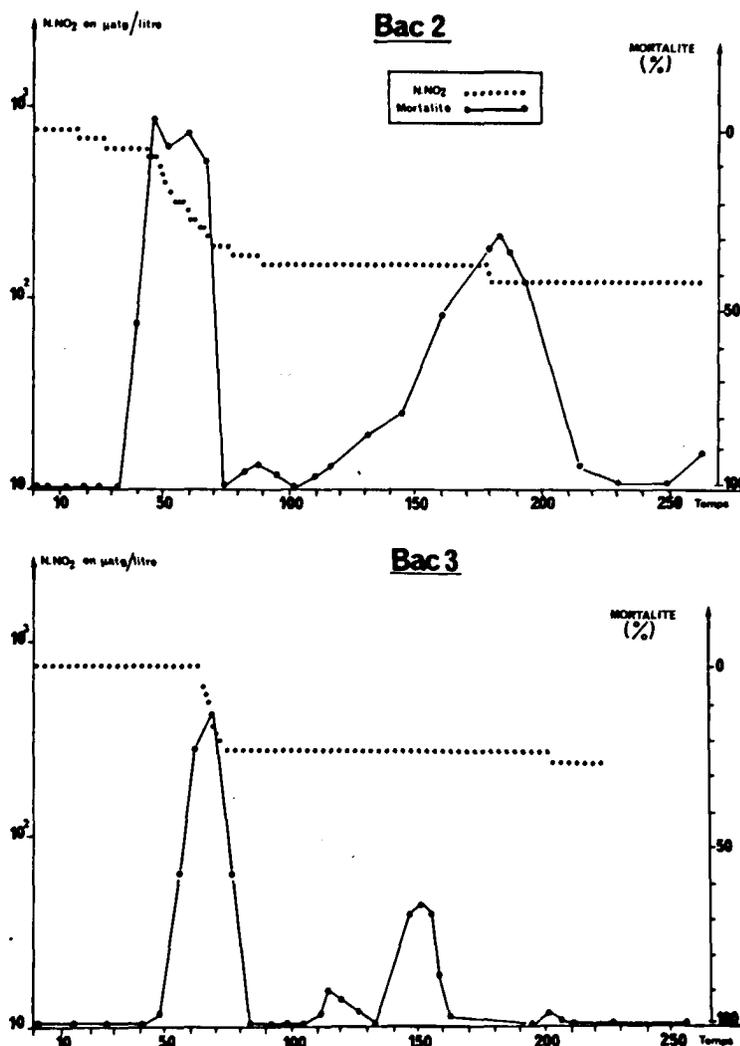


Figure 7 : Le nitrite provoque une forte mortalité sur les crevettes.

Elle touche essentiellement les crevettes les plus âgées : 100% et 70% des représentants de ce premier lot sont touchés respectivement dans les bacs 2 et 3. Par contre seulement 13% du deuxième lot est atteint dans le bac 2. Cette première observation montre que les crevettes les plus jeunes sont moins sensibles au nitrites. Il semble qu'il y ait des seuils de toxicité qui varient selon l'âge des crevettes : plus elles sont âgées, plus ce seuil est bas. Cette observation est en accord avec les travaux de WICKINS (1976) qui a également travaillé sur Panaeus japonicus et a trouvé des seuils de toxicité beaucoup plus élevés que les nôtres car il a utilisé des animaux beaucoup plus jeunes (0,1 g).

Les résultats obtenus dans le bac 2 révèlent une mortalité supérieure à celle du bac 3. Ceci semble lié au fait que le maximum de nitrite atteint dans ce dernier bac est inférieur à celui trouvé dans le bac 2. Au moment des deuxièmes apparitions de nitrite dans les bacs, il n'y a pas de mortalité dans le bac 3 car les pics de nitrite sont très faibles. Par contre dans le bac 2 cette deuxième augmentation de nitrite atteint 200 µatg N-NO<sub>2</sub>/litre. Il s'en suit une petite mortalité.

### 3 - DISCUSSION

#### 1. Paramètres intervenant dans la régulation du nitrite

La production de nitrite qu'elle soit due à la nitrification ou à la réduction de nitrate, n'est observée que dans les bacs 2 et 3. Dans l'eau du bac témoin, à aucun moment le nitrite n'a été décelé. L'apparition de ces sels azotés serait donc liée à la présence des crevettes dans les bacs. Leur présence impliquerait un enrichissement du milieu par les excréments azotés ou par l'excès de matière organique apporté par la nourriture. Elles peuvent également apporter une microflore spécifique dans le milieu d'élevage. Cependant, lors de l'étude expérimentale sur les conditions de production du nitrite, l'eau et le sable du bac témoin révèlent une capacité aussi grande que ceux des bacs 2 et 3 (avec crevettes) à produire du nitrite aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose. La microflore responsable de ces métabolismes préexisterait donc dans le milieu d'élevage. Elle serait activée, selon les cas, par un certain seuil de NH<sub>3</sub>, de NO<sub>3</sub> ou de matière organique ; et ces seuils seraient liés à la présence des crevettes dans le milieu.

La comparaison des productions de nitrite dans les bacs 2 et 3 montre que dans ce dernier, les intensités de nitrite sont toujours plus faibles que dans le bac 2. On sait que ces deux bacs diffèrent par la granulométrie de leur sédiment qui est caractérisée par un mode de 500 µ pour le bac 2 et par des modes de 160 µ et 1600 µ pour le bac 3. De plus, le taux de filtration est respectivement de 120 litres / h / m<sup>2</sup> et 210 litres / h / m<sup>2</sup>. Ces deux paramètres ainsi que l'épaisseur du sable et la charge en matière organique du milieu sont tous liés à la consommation d'oxygène par le sédiment (HIRAYAMA, 1962). Tous ces facteurs interviennent donc par l'intermédiaire de la concentration d'oxygène sur l'intensité de production du nitrite

#### 2. Toxicité des sels azotés

Du fait de la perméabilité cellulaire, l'ammoniac non-ionisé (NH<sub>3</sub>) est hautement toxique pour les animaux marins, et ceci à de faibles concentrations. En effet, WICKINS (1976) montre qu'une concentration de 92 µatg N-NH<sub>4</sub>/litre provoque en 48 heures une mortalité de 50% dans une population de Penaeus japonicus de 0,1 g, élevées en circuit clos. Mais il faut noter qu'en solution aqueuse l'ammoniac non ionisé est instable et est rapidement ionisé en NH<sub>4</sub> qui n'est absolument pas toxique pour les animaux. Le pourcentage de NH<sub>3</sub> en solution aqueuse varie en fonction du pH et de la température (WARREN et SCHENKER, 1962) A 20° C et à pH = 8,1 seulement 6% de l'azote ammoniacal est sous forme non ionisée. Si on considère les maximum d'azote ammoniacal atteints dans nos bacs 242 et 70 µatg N- ammoniacal/litre ce qui correspond respectivement à 14,5 et 4,2 µatg N-NH<sub>3</sub>/litre. Ces valeurs sont très faibles par rapport à celles obtenues par WICKINS (1970). Il n'est donc pas étonnant que NH<sub>3</sub> n'est pas provoqué de mortalité.

Pour ce qui concerne le nitrite, les seuils provoquant la mortalité dans nos bacs sont inférieurs à ceux obtenus par WICKINS (1976). Comme il a été dit

plus haut, ces seuils de toxicité sont d'autant plus bas que les animaux sont plus âgés.

Le nitrate selon le schéma de la nitrification classique, devraient s'accumuler et atteindre des niveaux tels qu'il pourrait devenir toxique pour les animaux. Cependant, dans un système équilibré, ce nitrate peut être réutilisé par le phytoplancton ou les bactéries dénitrifiantes présents dans le milieu (SIDDAL, 1974). C'est peut être ce qui se passe dans les bacs expérimentaux étudiés ici car le taux de nitrate reste relativement stable.

#### CONCLUSION

Comme nous l'avons vu dans cette étude, des Pénéides (Penaeus japonicus) ont été élevées dans des bacs expérimentaux fonctionnant en circuit clos. Dans de tels bacs, l'apparition du nitrite est liée d'une part au déroulement normal de la nitrification et d'autre part à une déficience en oxygène du milieu. A partir d'un certain taux, ce nitrite provoque la mortalité des crevettes. La concentration d'oxygène dissous et, par la même, le taux du nitrite présent apparaît donc comme étant le facteur principal du bon développement des crevettes dans des bacs fonctionnant en circuit clos. Cependant l'étude de différents facteurs tels que la granulométrie, la vitesse de percolation, la quantité de bactéries et la charge en matière organique du milieu pourrait permettre de mieux appréhender le problème de l'équilibre du système et ainsi obtenir de meilleurs résultats.

#### BIBLIOGRAPHIE

- BOUCHER G. et S. CHAMROUX - 1976 - Bacteria and meiofauna in an experimental sand ecosystem. I : material and preliminary results. J. exp. mar. Biol. Ecol., 1976, 24, p. 237-243.
- BOUCHER G. et S. CHAMROUX - 1978 . 1 - à paraître.
- CAREY C - 1936 - The occurrence and distribution of nitrifying bacteria in the sea. J. Mar. Res. 1, p. 291-304.
- HIRAYAMA K - 1965. 1966 - Studies on water control by filtration through sand bed in a marine aquarium with closed circulating system. Bull. Jap. Soc. Scient. Fish., 31, p. 977-982 et p. 983-990 ; 32, p. 11-19 et 20-27 et p. 105-111.
- LAURENT - 1972) Cycle biologique de l'azote au sein des étangs ; Rôle des facteurs écologiques. Thèse de doctorat es sciences naturelles Université de Bordeaux - Talence.
- SIDDAL S.E. - 1974 - Studies of closed marine culture systems. Progress. Fish.Cult. 36 (1).
- SPOTTE et KING - 1974 - Marine aquariums in the research laboratory. Aqu. Systems inc., Eastlake, ohio.
- WARREN et SCHENKER - 1962 - Differential effect of fixed acid and carbon dioxide on ammonia toxicity. Amer. S. Physiol., 203, p. 903-906.
- WICKINS J. - 1976 - The tolerance of warm water prawns to recirculated water. Aquaculture, 9, p. 19-37.