

MEMOIRE PRESENTE A L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES
D'OCEANOGRAPHIE BIOLOGIQUE

CONTROLE BACTERIOLOGIQUE DANS DES
ELEVAGES D'*ARTEMIA SALINA*

par
André GERARD

Laboratoire d'Ecologie Marine
Centre Océanologique de Bretagne

- Septembre 1976 -

S O M M A I R E

1. INTRODUCTION

2. PROTOCOLES D'ETUDES

2.1. Travaux réalisés au laboratoire d'écologie du Centre Océanologique de Bretagne.

2.1.1. Enseignements acquis au cours des travaux antérieurs.

2.1.2. But des expériences en cours et méthodes d'étude.

2.2. Origines et interventions possibles des bactéries dans un tel élevage.

2.2.1. Sources de contamination bactérienne.

2.2.2. Niveaux d'intervention des bactéries.

2.3. Numération bactérienne.

2.3.1. Choix d'une méthode d'analyse.

2.3.2. Choix d'un milieu de culture.

3. ETUDE QUANTITATIVE

3.1. Première série d'expériences.

3.1.1. Numération bactérienne.

3.1.1.1. Difficultés techniques

3.1.1.2. Enseignements

3.1.2. Observations au niveau des paramètres mesurés.

3.1.2.1. Paramètres physiologiques des Artemia

3.1.2.2. Paramètres physico-chimiques du milieu

3.2. Deuxième série d'expériences.

3.2.1. Numération bactérienne.

3.2.1.1. Dans les élevages d'*Artemia salina*

3.2.1.2. Dans l'eau de mer filtrée

3.2.1.3. Contamination par les oeufs d'*Artemia*

3.2.1.4. Dans les cultures de *Tetraselmis suecica*

3.2.1.5. Autres contaminants

3.2.2. Observations au niveau des paramètres mesurés.

3.2.2.1. Ammoniaque et nitrite

3.2.2.2. Activités enzymatiques des *Artemia*

3.3. Estimation de la biomasse bactérienne.

3.3.1. Préambule.

3.3.2. Evaluation de la biomasse bactérienne.

3.3.3. Discussion.

3.4. Expériences en conditions physico-chimiques altérées.

3.4.1. Chocs thermiques.

3.4.2. Pollution cuivrique.

3.5. Essai d'amélioration de la qualité des cultures d'algues.

4. ETUDE QUALITATIVE.

4.1. Protocole d'étude.

4.2. Identification des souches.

5. CONCLUSION.

BIBLIOGRAPHIE

1. INTRODUCTION.

Des élevages d'*Artemia salina* en milieux non renouvelés sont réalisés au Centre Océanologique de Bretagne pour l'étude de la nutrition et le contrôle des taux physiologiques. Sur ces élevages, un certain nombre de paramètres sont mesurés en continu ou semi-continu : pH, température, oxygène dissous, nitrites, ammoniacque, biomasse chlorophyllienne... Les premières expériences avaient mis en évidence des variations dans le temps des paramètres mesurés avec des seuils d'équilibre résultant vraisemblablement d'une auto-régulation par les bactéries. Dans tous les écosystèmes aquatiques ou terrestres le rôle de la microflore bactérienne est primordial ; le métabolisme bactérien est un maillon essentiel des cycles vitaux du carbone, de l'azote et du soufre...

Nous nous proposons, en liaison avec l'écophysiologie de ces élevages, d'étudier l'évolution de la flore bactérienne dans son aspect purement quantitatif, seule une approche qualitative ayant été réalisée.

Dans un premier temps nous étudions la possibilité de relier les variations quantitatives des paramètres du milieu et des paramètres physiologiques des *Artemia* à l'inventaire quantitatif de cette microflore. En évaluant la biomasse bactérienne et en la comparant à celle des "algues-fourrage", le rôle des bactéries, en tant que source nutritive pour les *Artemia*, est analysé.

Les variations de la biomasse bactérienne et des paramètres physiologiques des *Artemia* sont étudiés ensuite dans des conditions de pollutions thermique et cuivrique et un essai d'amélioration de la qualité des algues-fourrage est tenté, par la recherche de souches alguales "bacteria-free".

La dernière partie de ce rapport est consacrée à l'étude qualitative de trois souches bactériennes isolées des élevages d'*Artemia salina* et des cultures de *Tetraselmis suecica*.

Il est important de souligner ici que ces contrôles bactériens ne pouvaient pas déborder du cadre du protocole expérimental mis en place au laboratoire d'écologie du C.O.B. Certaines déductions, telles que celles relatives au rôle nutritif des bactéries envers les *Artemia*, n'ont pu être faites qu'à la suite d'incidents expérimentaux ; le protocole, par lui-même, ne se prête pas à une telle étude.

2. PROTOCOLES D'ETUDES.

2.1. Travaux réalisés au laboratoire d'écologie du Centre Océanologique de Bretagne.

2.1.1. Enseignements acquis au cours de travaux antérieurs.

Les expériences réalisées par le laboratoire d'écologie marine du C.O.B. ont mis en évidence l'existence de relations liant les activités enzymatiques digestives des principales espèces composant le zooplancton et leurs conditions de nutrition.

Les recherches sont menées sur deux fronts :

- L'analyse *in situ* des variations d'activité des enzymes digestives en fonction des conditions trophiques et du rythme journalier ;

- La recherche *in vitro* des relations quantitatives et qualitatives liant l'activité spécifique de ces enzymes aux conditions de nutrition, aux taux d'ingestion et d'assimilation.

Il ressort des premiers travaux que la relation entre les activités enzymatiques et la valeur d'indice de nutrition est complexe. Les activités de l'amylase et des protéases dépendent aussi bien d'une fonction biologique des organismes (âge, conditions de développement, état physiologique) que des conditions de nutrition (BOUCHER & SAMAIN, 1975).

Les mécanismes de régulation des activités enzymatiques digestives ont été étudiés expérimentalement pour *Artemia salina* (SAMAIN *et al.*, 1975). Ces travaux montrent que des corrélations significatives lient l'activité spécifique de l'amylase aux taux d'ingestion et d'assimilation, qu'il existe une adaptation des activités amylasique et trypsique en fonction de la quantité et de la qualité de la nourriture disponible.

Dans les milieux pauvres ou dépourvus en phytoplancton, l'analyse protéique a conduit à formuler l'hypothèse de la présence de particules nutritives différentes des cellules végétales qui peuvent être soit des pelotes fécales, des débris organiques, soit des bactéries.

2.1.2. But des expériences en cours et méthodes d'étude.

Les expériences présentes ont pour but de rechercher *in vitro* les facteurs internes et externes influençant les sécrétions enzymatiques digestives.

Les Artemia sont élevés en laboratoire à la température de 20°C dans de l'eau de mer filtrée à 0,3 μ . L'élevage se fait dans des aquariums de 20 litres en milieux non renouvelés. Toutefois, de l'eau de mer filtrée est ajoutée régulièrement en fonction de la densité et de la taille des Artemia et de l'apport de nourriture. Un élevage débute avec 1 litre environ et se termine avec 15 à 18 litres d'eau de mer. L'oxygénation est assurée par un bullage d'air comprimé et les aquariums sont exposés continuellement à une lumière artificielle.

C'est l'algue unicellulaire *Tetraselmis suecica*, cultivée au C.O.B. par l'équipe d'aquaculture, qui sert de nourriture aux Artemia. L'apport des algues-fourrage a été défini comme une fonction du poids des Artemia, du type :

$$\text{quantité de nourriture fournie} = k \times \text{poids des Artemia}$$

où k est une constante établie dans chaque protocole d'expérience. De plus, le volume final du milieu est ajusté de manière que la concentration d'algue dans l'élevage demeure la même après chaque apport de nourriture.

A chaque expérience, les conditions de nutrition sont donc définies par deux paramètres : l'un liant la quantité de nourriture à fournir aux poids des Artemia - l'autre établissant la concentration maximum des algues dans le milieu.

La mesure des protéines selon la méthode de LOWRY (1951) est automatisée

avec la mesure de l'amylase par iodométrie (SAMAIN & BOUCHER, 1974). La mesure de la trypsine est effectuée par réaction sur le réactif B.A.P.N.A.

Les *Artemia* sont mesurés à l'aide d'un micromètre sous une loupe binoculaire. Les comptages des cellules phytoplanctoniques sont effectués au microscope inversé au moyen d'une cellule de Malassez.

2.2. Origines et interventions possibles des bactéries dans un tel élevage.

2.2.1. Sources de contamination bactérienne.

Les bactéries de ces élevages d'*Artemia* ont pour origines :

- L'eau de mer recueillie pour les besoins de l'élevage, bien que préalablement passée dans un système de filtres dont le dernier est de 0,3 μ , représente une des principales sources de contamination bactérienne et qui peut devenir très importante en cas de rupture du système de filtration.

- Les oeufs d'*Artemia*, éclos préalablement dans un aquarium, sont une source de contamination au départ de chaque expérience.

- Les algues *Tetraselmis suecica* servant de nourriture aux *Artemia* sont élevées au C.O.B. dans des volumes incompatibles avec la recherche d'une culture véritablement axénique. En conséquence, l'apport quotidien de *Tetraselmis* contient une biomasse bactérienne que l'on doit surveiller.

- L'air est une source de contamination difficilement quantifiable et pourtant, selon BRISOU (1970) : "Environ 90% des bactéries appartenant à la biosphère se cultivent aisément sur des milieux préparés avec de l'eau de mer naturelle."

- Les différentes manipulations réalisées pour les besoins de l'expérience sont effectuées avec des instruments non stérilisés (hormis les prélèvements pour les numérations bactériennes).

Les sources de contamination sont, à l'espèce élevée près, identiques à celles retenues par LUCAS & PRIEUR (1974) à propos des élevages de Bivalves marins et dont on peut en tirer un schéma général pour l'étude des bactéries associées aux élevages d'invertébrés marins.

2.2.2. Niveaux d'intervention des bactéries.

Le milieu n'étant pas renouvelé, nous pouvons nous attendre à une modification de celui-ci résultant du métabolisme des *Artemia* et de l'activité régulatrice des bactéries. En milieu non renouvelé, les déchets organiques et minéraux sont de toutes sortes : cadavres d'*Artemia*, de *Tetraselemais* et de bactéries ; débris de mues ; produits du métabolisme des *Artemia* (pelotes fécales, excrétion ammoniacale). Les bactéries qui transforment tous ces déchets peuvent entraîner l'accumulation dans le milieu de substances telles que : ammoniacque, nitrites, nitrates, phosphates...

Une prolifération anarchique des bactéries pourrait épuiser l'oxygène du milieu et entraîner, par l'utilisation des sulfates et nitrates comme source énergétique, l'accumulation d'ammoniacque et d'hydrogène sulfuré. Pour éviter un tel système de dégradation (métabolisme anaérobie) il faut assurer une bonne oxygénation des élevages d'*Artemia*.

Les bactéries peuvent également représenter une source de nourriture pour les *Artemia*, surtout de nature protéique, puisqu'elles contiennent de 35 à 80% de protéines en poids sec. L'ingestion des bactéries par les *Artemia* se fait certainement de façon continue puisque ces derniers se nourrissent de particules ou d'algues inférieures à 20 μ et que les bactéries se fixent préférentiellement

sur ce type de particule. Seulement l'ingestion n'entraîne pas forcément la digestion et l'assimilation. SAMAIN *et al.* (1975) ont montré que chez *Artemia salina* la synthèse de l'amylase est activée en relation avec l'accroissement de la concentration en phytoplancton. Le métabolisme digestif s'orienterait vers une source de calories de haut rendement à base glucidique en présence de phytoplancton et les pelotes fécales rejetées dans une telle digestion auraient une forte teneur protéique.

Les bactéries sembleraient donc être une source possible de nourriture dans des milieux pauvres ou dépourvus de phytoplancton. Ainsi SAMAIN *et al.* (1975) ont mis en évidence, dans un élevage d'*Artemia salina* exposé à la lumière naturelle, une activation de l'amylase le soir en relation avec le "grazing" du phytoplancton, et, au cours d'une nutrition secondaire diurne, une activation de l'amylase et des protéases par des particules autres que du phytoplancton et qui peuvent être soit des pelotes fécales, soit des bactéries ou des débris organiques.

2.3. Numération bactérienne.

2.3.1. Choix d'une méthode d'analyse.

Nous nous proposons de faire l'inventaire quantitatif des bactéries des élevages d'*Artemia salina* : il faut pour cela faire le choix d'une technique adaptée à ce type d'étude. BIANCHI A. & BIANCHI M. (1971) ont bien analysé les différentes méthodes de numération des populations bactériennes du milieu marin. La numération directe au microscope fournit des valeurs très supérieures à la réalité car elle ne fait pas la distinction entre les cellules viables et les cadavres bactériens.

Les méthodes indirectes après culture des échantillons fournissent des résultats inférieurs au nombre réel d'organismes, car il n'existe pas de milieu de culture permettant le développement simultané de tous les types trophiques

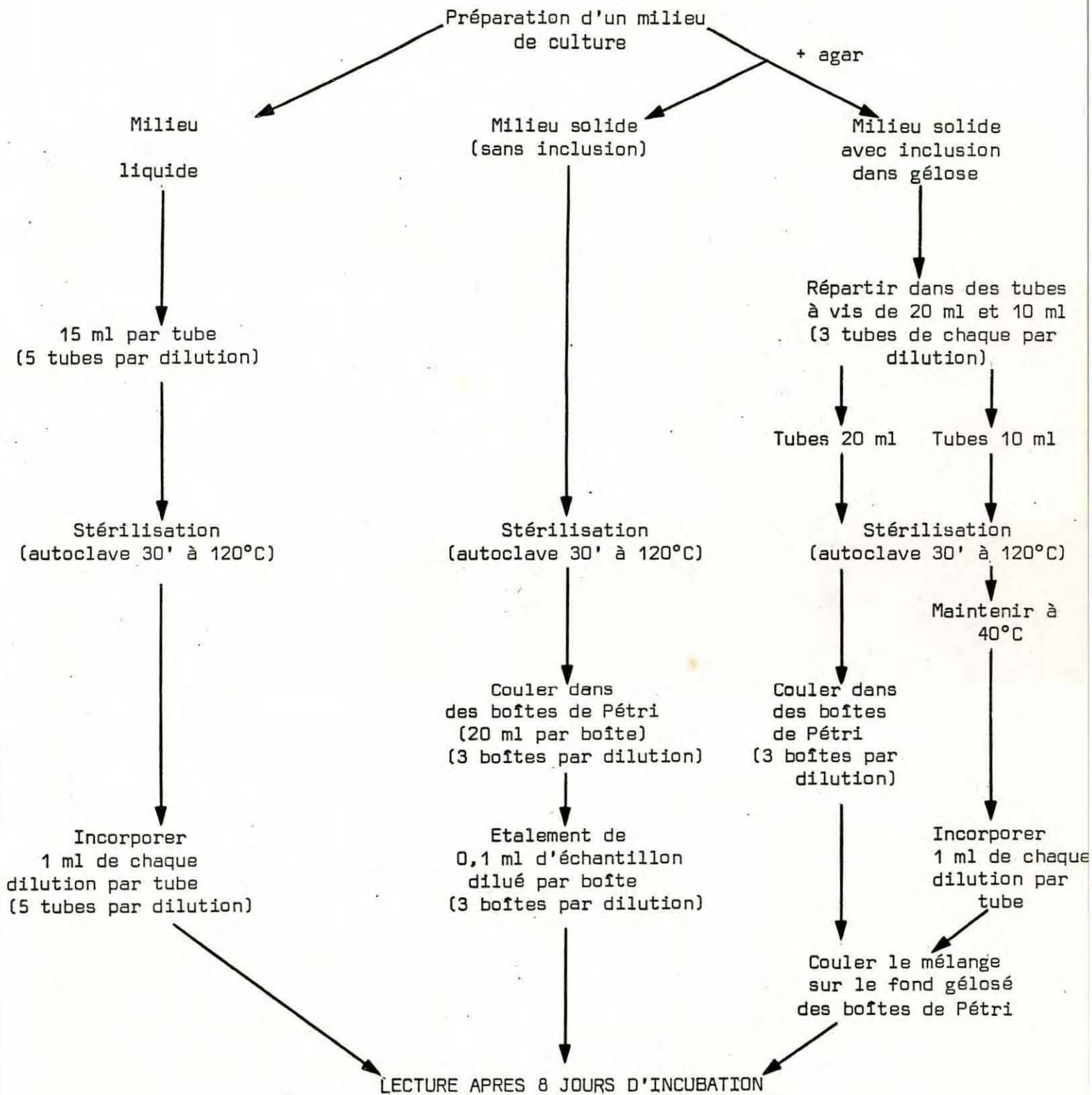
pouvant coexister dans un même milieu naturel, et, selon BRISOU (1963), très souvent les germes forment des amas difficilement séparables qui se comportent en culture comme un seul germe. Toujours selon cet auteur, cette méthode peut fournir des résultats erronés par défaut, pouvant être inférieurs de 100 à 5 000 fois aux concentrations bactériennes vraies.

La méthode directe est incompatible avec notre étude, car elle réclame un appareillage d'optique précis, de plus par cette méthode, il est difficile de distinguer les germes vivants des cadavres, ou même de certaines particules inertes ; or dans un milieu non renouvelé les détritrus organiques extrêmement fins sont très nombreux et peuvent se confondre avec les bactéries.

La méthode indirecte correspond plus à nos besoins, c'est d'ailleurs la plus fréquemment utilisée en microbiologie écologique. Le tableau 1 résume les différentes méthodes de numération indirecte.

Nous avons choisi la culture par étalement sur milieu gélosé qui permet d'effectuer des comptages différentiels dans le cas où une souche est très représentée dans l'échantillon et qui permet un isolement rapide de souches pour une étude qualitative. Cette technique est couramment employée au laboratoire de zoologie pour le contrôle bactériologique des élevages de Bivalves marins.

Tableau 1 : Differentes méthodes indirectes de numération des populations bactériennes



2.3.2. Choix d'un milieu de culture.

Nous avons vu qu'il n'existe pas de milieu de culture universel permettant d'évaluer l'infinité de types microbiens susceptibles de coexister dans un même milieu naturel. En conséquence, avant chaque étude microbiologique, on devrait rechercher le milieu qui donne les meilleurs résultats quantitatifs. Toutefois, comme le soulignent BIANCHI A. & BIANCHI M. (1971) en se référant à FLOODGATE (1964) : "tous les milieux où peptone et extraits de levures sont en concentration pléthorique, permettent des développements bactériens comparables dans la limite de fidélité des numérations."

De plus, un milieu de culture donnant le résultat quantitatif le plus élevé, n'est pas forcément le meilleur, car comme le mentionne HUSSENOT (1972), les milieux artificiels peuvent permettre le développement de micro-organismes qui ne sont pas fonctionnels dans l'écosystème.

A notre avis il est donc inutile, dans une telle étude, d'essayer de tester l'efficacité de tel ou tel milieu ; ce qui importe surtout dans une numération appelée à tort "microflore totale" c'est de bien préciser la méthode d'analyse et le milieu de culture employés.

De ce fait, pour notre étude nous avons utilisé le milieu 2216 E d'OPPENHEIMER & ZOBELL (1952) qui est un des plus couramment employés. BIANCHI (1971)(1973) - MAYZAUD & DALLOT (1973) - PRIEUR & LE ROUX (1975).

Bacto-peptone Difco	4 g
Extraits de levures Difco	1 g
Phosphate ferrique	0,1 g
Agar	15 g
Eau de mer vieillie	750 ml
Eau distillée	250 ml

3. ETUDE QUANTITATIVE.

3.1. Première série d'expériences en conditions physico-chimiques normales.

Cette expérience a surtout permis de mettre au point la technique de numération des populations bactériennes et de définir les orientations futures des comptages notamment au niveau des sources de contamination.

L'élevage comportait deux aquariums dont les conditions de nutrition étaient identiques et définies par les paramètres suivants :

Bac 1	Concentration max. d'algues : 300×10^6 g/l
Bac 2	$k = 300 \times 10^2$

3.1.1. Numération bactérienne.

3.1.1.1. Difficultés techniques : Des difficultés inattendues ont marqué cette première expérience. En effet, la présence d'une souche bactérienne pourvue d'une mobilité exceptionnelle pendant la phase de croissance de la colonie a rendu inutilisable la majorité des résultats des comptages bactériens. Cette souche, en colonisant rapidement la surface du milieu gélosé, inhibe la croissance des autres colonies, si bien que dans les cas les plus défavorables aucune autre souche ne peut se développer. Les boîtes de Pétri sont alors apparemment vierges ou ponctuées de minuscules colonies. En réalité, la surface de chaque boîte de Pétri est recouverte d'un mince film bactérien, facilement observable quand le germe est peu représenté dans l'échantillon, car il ne couvre pas la totalité de la surface du milieu gélosé (photos n° 1 & 2).



Photo 1 : "Germe migrant" envahissant une boîte de Pétri

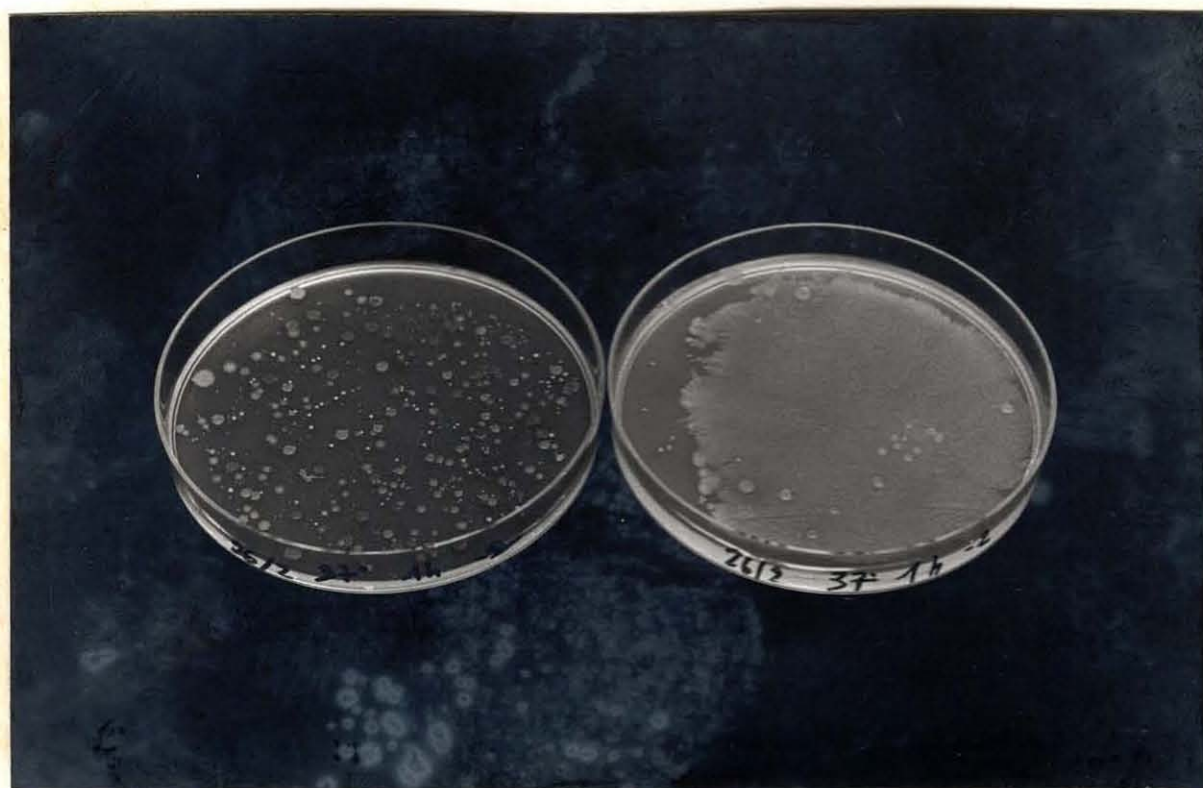


Photo 2 : Etalement, avec et sans inclusion sous gélose blanche, d'un échantillon contenant le "germe migrant"

A ce stade de l'étude, il était matériellement impossible de modifier le choix de la technique de numération. Aussi pour poursuivre nos recherches, nous avons employé la méthode suivante : les étalements sur boîtes de Pétri se font selon la technique habituelle, mais pour chaque dilution nous préparons quatre boîtes dont deux sont recouvertes, après étalement de l'échantillon, d'une mince couche de gélose blanche (Agar + eau distillée à 15‰).

Cette technique inhibe la migration du germe ou la retarde. Lorsqu'il est totalement absent dans les boîtes sans gélose blanche, nous pouvons tester l'efficacité de la méthode par un comptage comparatif des différentes boîtes d'une même dilution. Nous avons obtenu ainsi un certain nombre de résultats permettant de vérifier que l'apport de gélose blanche n'affecte pas la qualité des résultats quantitatifs.

Tableau 2 : Comparaison entre les boîtes d'une même dilution avec ou sans inclusion sous gélose blanche en absence du "germe migrant"

	Avec inclusion	Sans inclusion
Nombre de Colonies	217	227
	38	43
	77	81
	353	363
	160	80
	515	289
	167	202
	68	80
	149	128
	98	72
	280	269
	74	78
	123	123
	403	394

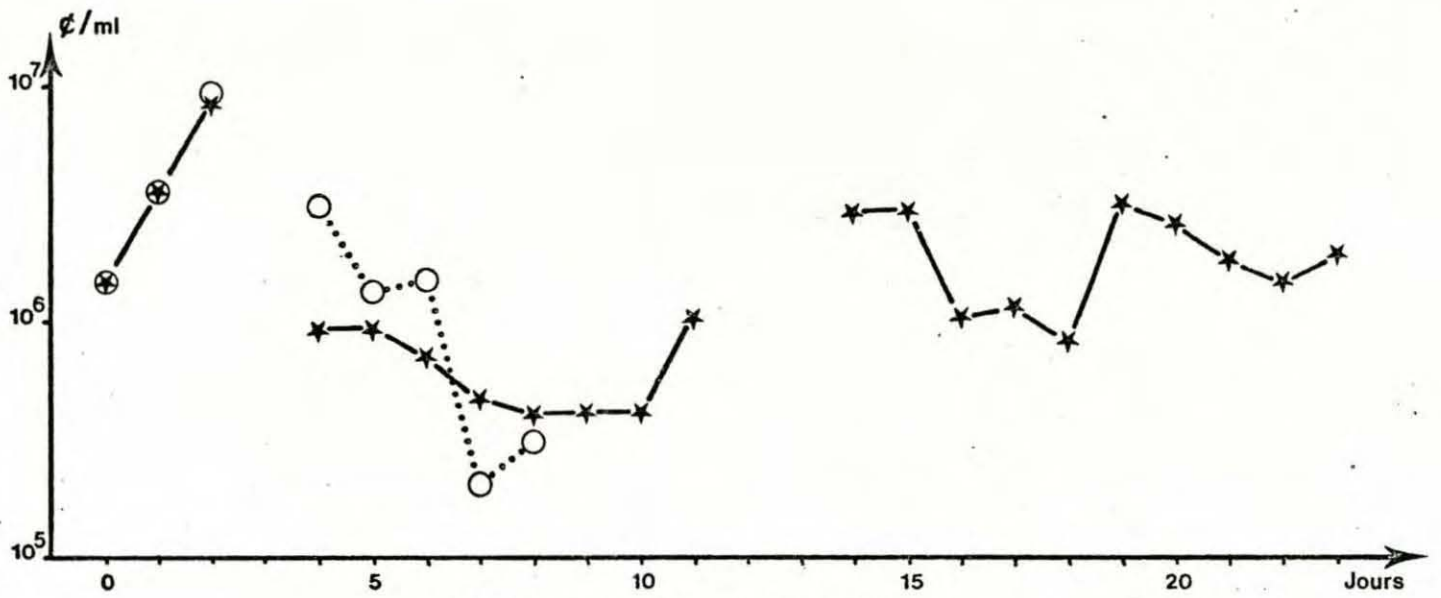


Fig.1: NUMERATION BACTERIENNE

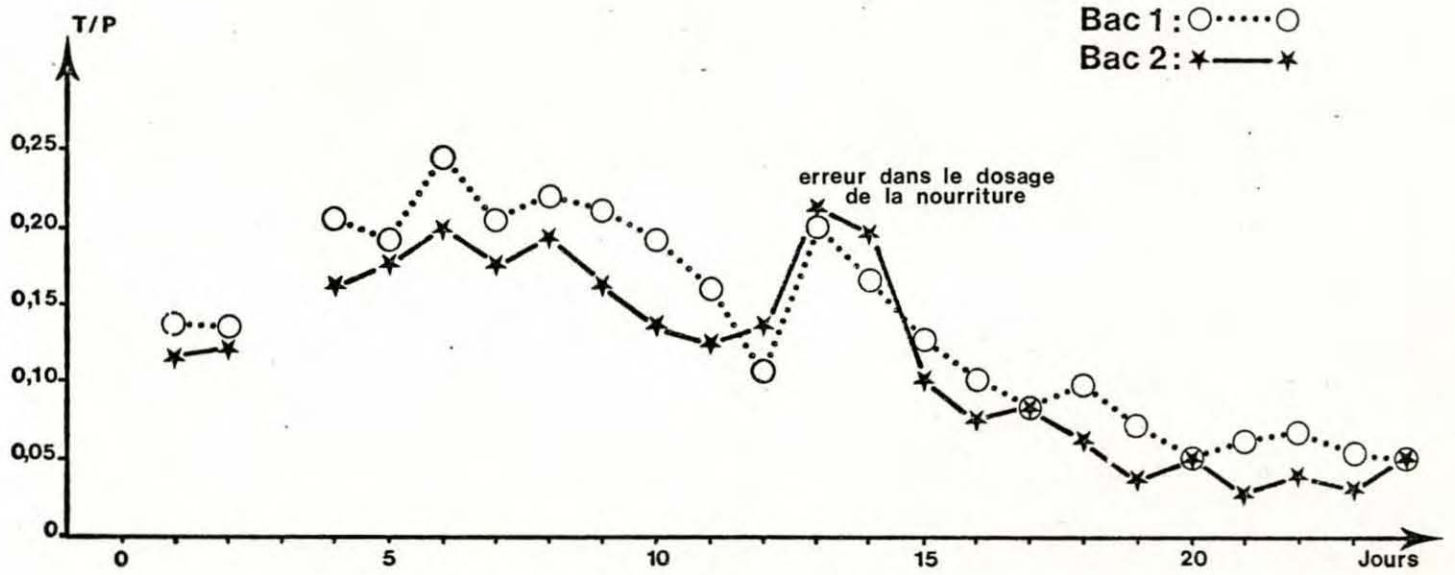


Fig.2: ACTIVITE TRYPSIQUE

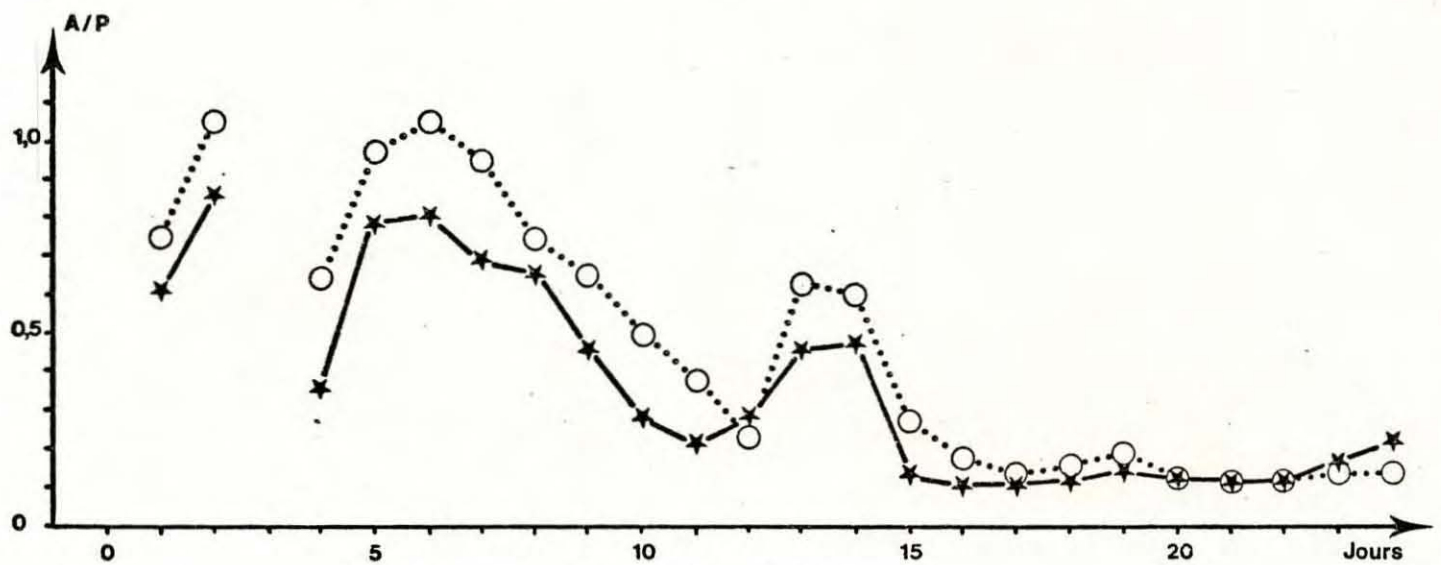


Fig.3: ACTIVITE AMYLASIQUE

3.1.1.2. Enseignements (Fig. 1) : Bien que les résultats soient en partie faussés par la présence du "germe migrant", il est tout de même possible de faire quelques constatations :

- Pendant les 8 premiers jours de l'expérience, les comptages peuvent être considérés comme exacts puisque le "germe migrant" ne s'est pas manifesté. Pendant les trois ou quatre premiers jours, nous assistons à une rapide colonisation du milieu avec une croissance bactérienne de type exponentiel. Ensuite, on assiste à une forte décroissance et à une stabilisation du nombre de germes aux alentours de 10^6 g/ml.

- La phase de décroissance peut s'expliquer de différentes manières :
 - par l'épuisement du milieu, la disparition de substances nécessaires à la croissance de certaines souches bactériennes ;
 - par l'accumulation dans le milieu de produits métaboliques toxiques ;
 - par la disparition de certains germes ayant servi de nourriture aux Artemia ;
 - par le rôle du 3e jour d'expérience qui est caractérisé par l'absence totale d'apport de nourriture aux Artemia et de mesures des différents paramètres. Ce jour de jeûne forcé est peut-être responsable d'une prédation accrue des Artemia envers les bactéries.

Les données recueillies ne sont pas assez nombreuses pour répondre avec assurance à ce problème ; toutefois l'analyse des activités enzymatiques des Artemia permet de justifier le bien-fondé de certaines hypothèses.

3.1.2. *Observations au niveau des paramètres mesurés.*

3.1.2.1. Paramètres physiologiques des Artemia (Fig. 2 & 3) :
L'activité spécifique de l'amylase est donnée par le rapport des unités enzymatiques mesurées par ml à la masse protéique dans le même volume. L'unité enzymatique étant la quantité d'enzyme nécessaire pour "dextriniser" 1 mg d'amidon par minute pour un dosage à l'iode (SAMAIN & BOUCHER, 1974).

L'activité spécifique de la Trypsine est donnée par le rapport de la concentration de Trypsine par ml à la masse protéique du même volume de l'échantillon.

Toute relation entre les variations des activités enzymatiques digestives des *Artemia salina* et les variations quantitatives des bactéries est bien difficile à établir du fait de la présence dans le milieu de particules nutritives, différentes des cellules bactériennes, telles que les algues unicellulaires et les particules organiques inertes. Toutefois, les incidents d'expérimentation, tel que le jeûne forcé du 3e jour, peuvent aider à relier les variations de la biomasse bactérienne à celles des activités enzymatiques.

L'absence d'apport de *Tetraselmis* le soir du 3e jour entraîne une chute brutale de l'activité spécifique de l'amylase au 4e jour, tandis que l'activité spécifique de la Trypsine continue de croître. La diminution de l'activité amylasique est compréhensible puisque la principale substance de réserve des *Tetraselmis* est l'amidon ; par contre, l'activité trypsique indique une utilisation d'une nourriture protéique d'origine différente des cellules alguales (bactéries, pelotes fécales...). Dans le même temps, la disparition entre le 2e jour et le 4e jour de 6×10^6 germes bactériens par millilitre semblerait confirmer l'hypothèse d'une prédation accrue des *Artemia* envers les bactéries.

Seulement, après les nouveaux apports en *Tetraselmis* (5e jour et suivants) nous n'enregistrons pas de diminution significative dans l'activité spécifique de la Trypsine, pas plus que la reprise d'une croissance bactérienne. La prédation ne peut donc être l'unique cause de la disparition des bactéries.

La thèse la plus probable semble être l'action simultanée de la prédation par les *Artemia* et de l'épuisement du milieu par la raréfaction de certains nutriments ~~et~~ par dégagement de produits métaboliques toxiques. Par la suite l'action de ces deux phénomènes tend à limiter la concentration bactérienne aux alentours de 10^6 z/ml.

Par ailleurs il est important de souligner l'intensité de l'activité trypsique qui demeure très supérieure durant la première moitié de l'expérience,

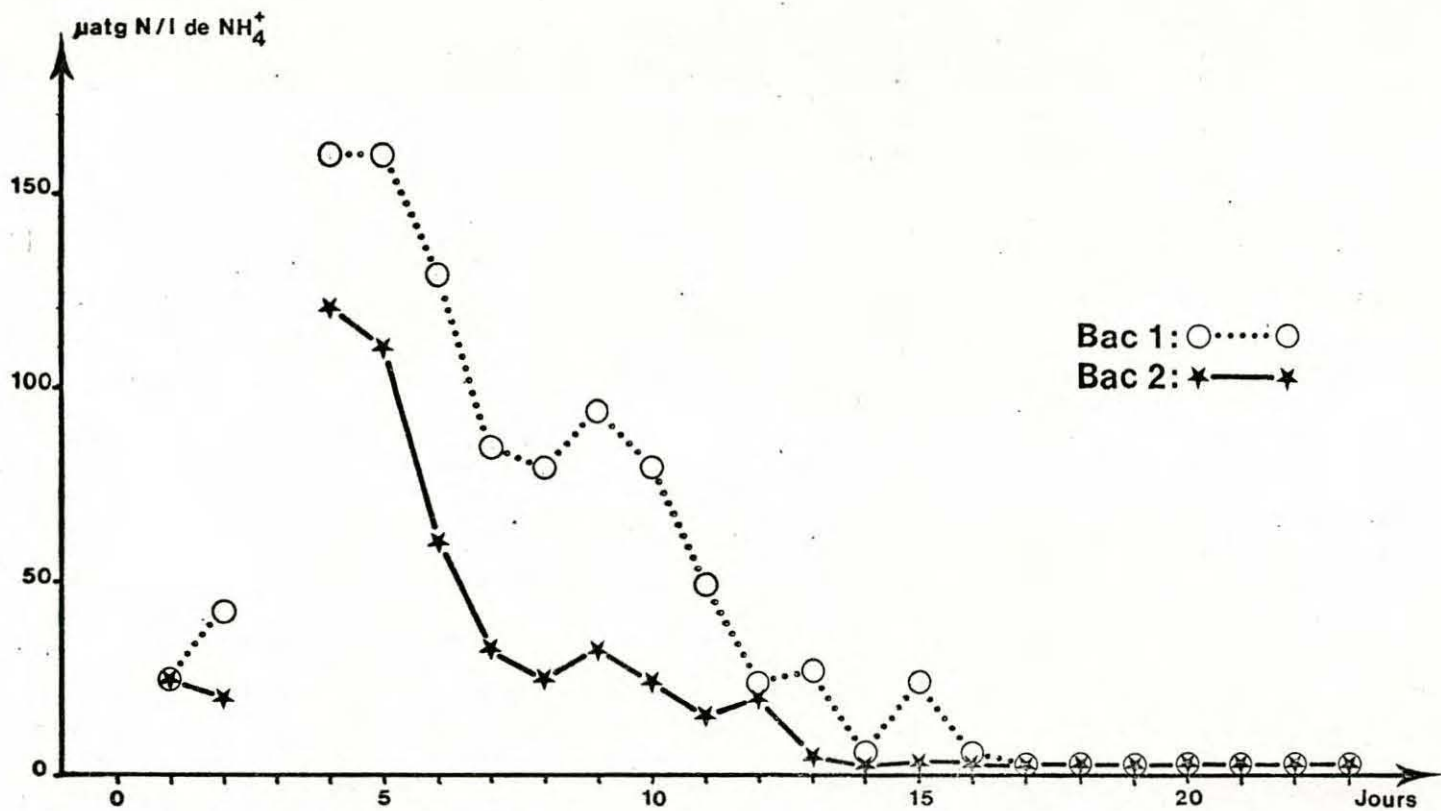


Fig.4: TENEUR EN IONS AMMONIUM

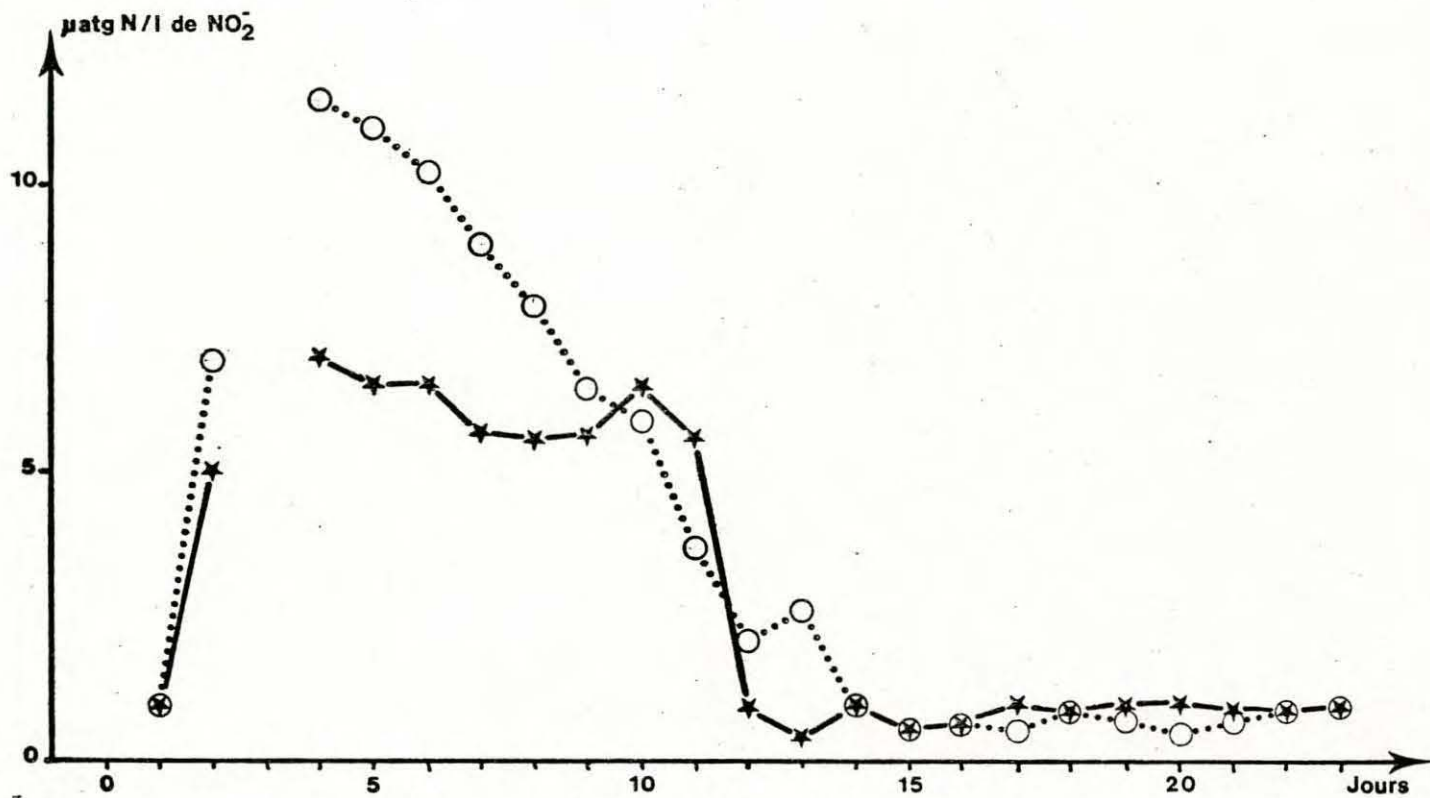


Fig.5: TENEUR EN NITRITES

à celle enregistrée dans les mêmes conditions de nutrition au cours d'autres séries d'essais. Ceci semble indiquer que les *Tetrasetimis*, mis à la disposition des *Artemia*, ne possèdent pas les réserves glucidiques en amidon suffisantes pour permettre à ces crustacés de faire face à leur besoin énergétique. Les *Artemia* utilisent certainement dans ce cas une forte proportion de protéines contenues dans les *Tetrasetimis*.

3.1.2.2. Paramètres physico-chimiques du milieu : un certain nombre de paramètres sont mesurés au cours de ces expériences, mais seuls sont étudiés ceux présentant des variations susceptibles d'être reliées aux métabolismes des bactéries et des *Artemia*. Nous n'analyserons donc que les concentrations en ammoniacque et nitrites (Fig. 4 & 5).

Durant cette première expérience, les teneurs enregistrées en ions ammonium et nitrites sont anormalement élevées et seraient toxiques pour de nombreux animaux si l'on se réfère à BREMOND & VUICHARD (1973). D'après ces auteurs, des concentrations de 2,5 mg/l d'ammoniacque total pour un pH compris entre 7,4 et 8,5 sont dangereuses pour la plupart des espèces. La concentration létale pour des *Daphnies* serait de l'ordre de 8 mg/l.

La forme sous laquelle se trouve l'ammoniacque en solution est déterminante pour son degré de toxicité ; en effet, seule sa forme non ionique est dangereuse et le pourcentage de celle-ci par rapport à l'ammoniacque total est une fonction croissante de la température et du pH. Plus ce dernier augmente, et plus l'équilibre $\text{NH}_3\text{-NH}_4^+$ se déplace vers NH_3 , d'où un risque d'intoxication fortement accru.

L'abaque proposé par PETIT & FERRON (1975) donne les valeurs suivantes pour le bac 1 :

Tableau 3 : Teneur en ammoniacque dans le bac 1 les 4e et 5e jours

Jour	Concentration en ions NH_4^+ mesurée	pH	Ammoniacque total	Forme non ionique toxique : NH_3
4e	2,88 mg/l	8,4	3,20 mg/l	0,32 mg/l
5e	2,88 mg/l	8,2	3,09 mg/l	0,21 mg/l

Nous voyons que pour une même concentration en ions ammonium mesurée, la forme non ionique est plus importante le 4e jour que le 5e.

Nous ne possédons pas de seuil de toxicité pour les Artemia, néanmoins les concentrations en ammoniacque et nitrites que nous avons rencontrées ne les ont apparemment pas affectés. Seul un léger retard dans leur croissance est observé, mais celui-ci incombe sûrement plus aux mauvaises conditions de nutrition durant les premiers jours.

Toutefois nous avons recherché la cause de ces fortes teneurs en éléments azotés dans le milieu et il semble que plusieurs phénomènes en soient responsables :

* Nous pouvons penser que les Artemia ont un rôle important dans l'apport d'ammoniacque dans le milieu. Nous avons vu précédemment que durant cette expérience, l'activité trypsique est intense, indiquant une orientation secondaire du métabolisme digestif vers une digestion protéasique pour remédier aux apports glucidiques déficients. Les acides aminés assimilés peuvent être incorporés dans de nouvelles protéines ou dégradés ; ils perdent, dans ce dernier cas, leur radical amine qui est éliminé sous forme d'ammoniacque. Ainsi nous pouvons soupçonner que l'utilisation plus importante des protéines durant cette expérience, a entraîné une excrétion ammoniacale plus intense.

Le jour du jeûne, ce phénomène est encore plus conséquent ; les Artemia orientent non seulement leur métabolisme digestif vers une digestion entièrement protéasique, mais de plus leurs protéines et acides aminés de certains tissus sont utilisés comme matériaux énergétiques. MAYZAUD & DALLLOT (1973) ont montré chez plusieurs espèces du zooplancton dont un crustacé amphipode, *Phronima sedentaria*, que le jeûne entraînait un catabolisme strictement protéique avec une forte excrétion ammoniacale. Cette thèse se voit confirmée dans la deuxième série d'expériences, où un jour de jeûne correspond exactement à forte augmentation de l'ammoniacque dans le milieu (11e jour de la deuxième série d'expériences).

* Mais le métabolisme des Artemia ne peut expliquer les fortes teneurs en ammoniacque et surtout en nitrites qui apparaissent dès le 2e jour, immédiatement

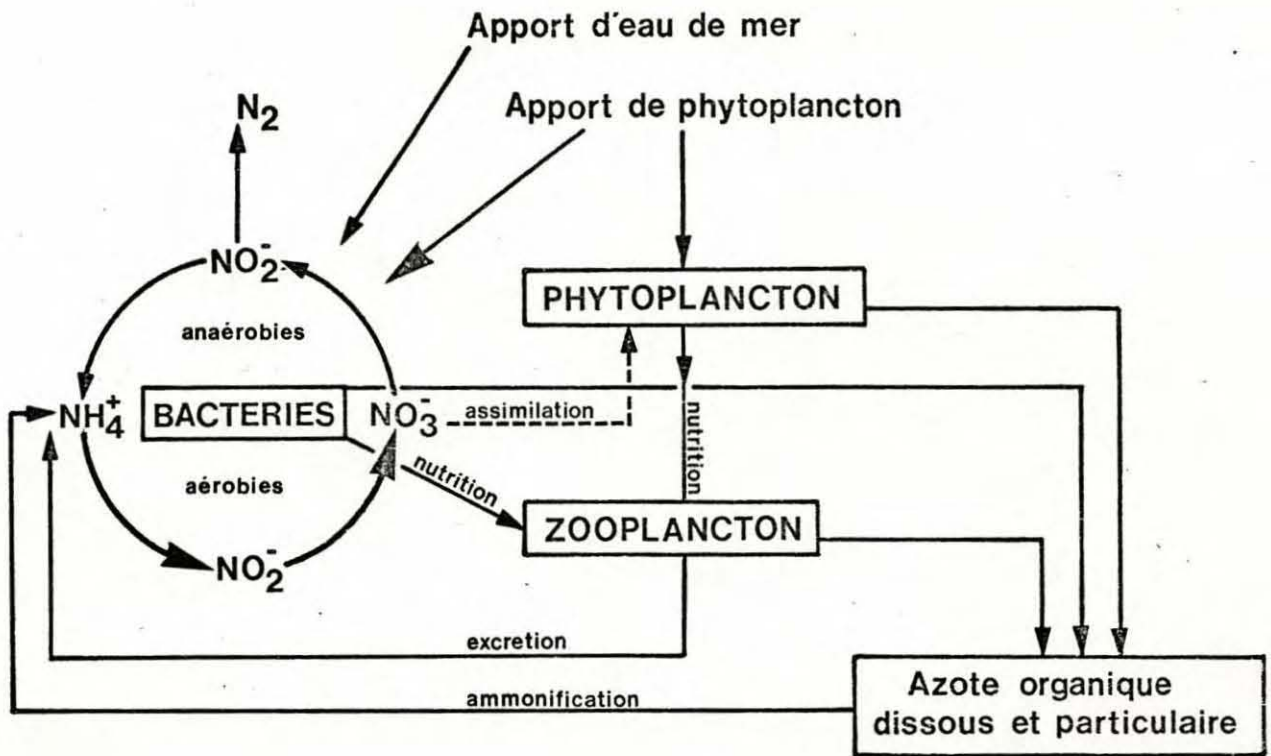
après la première addition de *Tetraselmis* dans les élevages. Durant les premiers jours de l'expérience, les Artemia ont été nourris avec une culture de *Tetraselmis suecica* effectuée dans notre laboratoire, mais celle-ci était d'une très mauvaise qualité. Nous avons vu précédemment que ces algues sont probablement responsables de l'intense activité trypsique, mais elles sont également à l'origine de la pollution du milieu par des éléments azotés :

. D'une part, la culture, du fait de sa déficience, peut comporter des cellules mortes en voie de décomposition. Le premier stade de la minéralisation bactérienne des déchets organiques est l'ammoniaque qui est en partie oxydé par les bactéries nitrifiantes en nitrites, puis en nitrates ;

. D'autre part, le faible rendement de la culture d'algues peut entraîner une mauvaise utilisation des éléments nutritifs qu'elle contient. Or, les éléments azotés entrent pour une grande part dans la composition du milieu de WALNE (1966) qui sert à enrichir l'eau de mer des élevages d'algues unicellulaires. Ce milieu contient :

100 g de Na NO_3 par litre de milieu

soit, $1175 \mu \text{atg N}$ sous forme de NO_3^- par litre de culture d'algues, si une partie non négligeable de cet azote n'est pas assimilée par les algues ; à chaque apport de nourriture aux Artemia, des nitrates, des nitrites et même un peu d'ammoniaque peuvent être transmis. CARVAL & PRIEUR (en préparation) qui travaillent actuellement sur ce sujet, signalent que dans de mauvaises conditions de culture, les apports d'algues-fourrage peuvent contenir jusqu'à $500 \mu \text{atg N/l}$ de nitrates et $10 \mu \text{atg N/l}$ de nitrites ; la concentration en ammoniaque restant toujours faible. Or dans notre cas, la culture d'algues employée était d'une qualité médiocre et de concentration alguale faible ($7,5 \times 10^5 \text{ g/ml}$), ce qui suppose que tous les éléments nutritifs n'ont pas été utilisés. Par ailleurs, du fait de sa faible concentration, un grand volume de cette culture est nécessaire pour la nourriture des Artemia, expliquant ainsi l'augmentation brutale des nitrites après les premiers apports de *Tetraselmis*. Le 1er jour, environ 600 ml de culture d'algues sont requis pour nourrir les Artemia ; le volume final de chaque bac après l'addition de *Tetraselmis* étant de 1,500 l. Par un simple calcul, nous trouvons que 6 à $10 \mu \text{atg N/l}$ de nitrites dans la culture d'algues suffisent à



**Fig.6: CYCLE DE L'AZOTE
DANS LES ELEVAGES D'ARTEMIA SALINA**

expliquer les concentrations observées le 2e jour dans les bacs d'*Artemia*, ce qui est tout à fait envisageable compte tenu des observations de CARVAL.

Le 5e jour d'expérience qui marque l'abandon de la culture de *Tetra-selmis* pour une autre en provenance du laboratoire d'aquaculture, met en évidence le rôle prédominant joué par les premières algues dans la pollution du milieu par les éléments azotés. En effet, nous enregistrons à partir de ce moment une décroissance progressive des teneurs en ammoniacque et nitrites dans les élevages qui, par l'action des dilutions successives et de la nitrification bactérienne, retrouvent des concentrations normales vers le 12e jour.

Afin de bien comprendre le cheminement des différents éléments azotés dans les élevages d'*Artemia*, nous avons réalisé un schéma simplifié, inspiré des différents cycles de l'azote que l'on peut trouver dans la bibliographie (Fig. 6).

3.2. Deuxième série d'expériences.

Les élevages d'*Artemia* comportent cette fois quatre aquariums dont trois ont été suivis bactériologiquement. Les conditions de nutrition ne sont pas les mêmes pour tous les aquariums :

Bac I	: k = 300×10^2	Concentration	
Bac II	: k = 300×10^2	alguale	300×10^6 g/l
Bac III	: k = 200×10^2	maximum	

Le bac II ne devrait pas être étudié dans ce chapitre puisqu'il a subi au départ des altérations chimiques. Il a été placé en excès d'ammoniacque et de nitrite afin d'étudier les variations quantitatives des bactéries et les réactions

NUMERATION BACTERIENNE

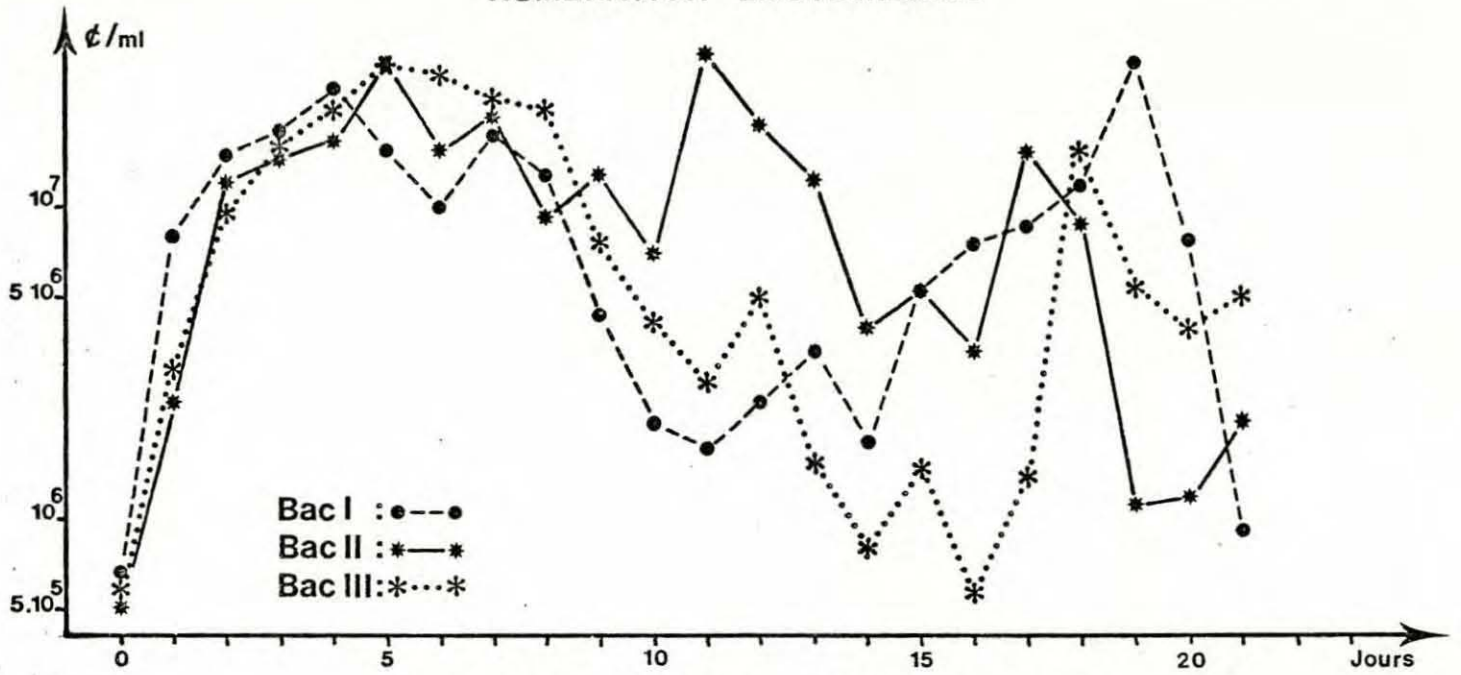


Fig.7: DANS LES ELEVAGES D'ARTEMIA SALINA

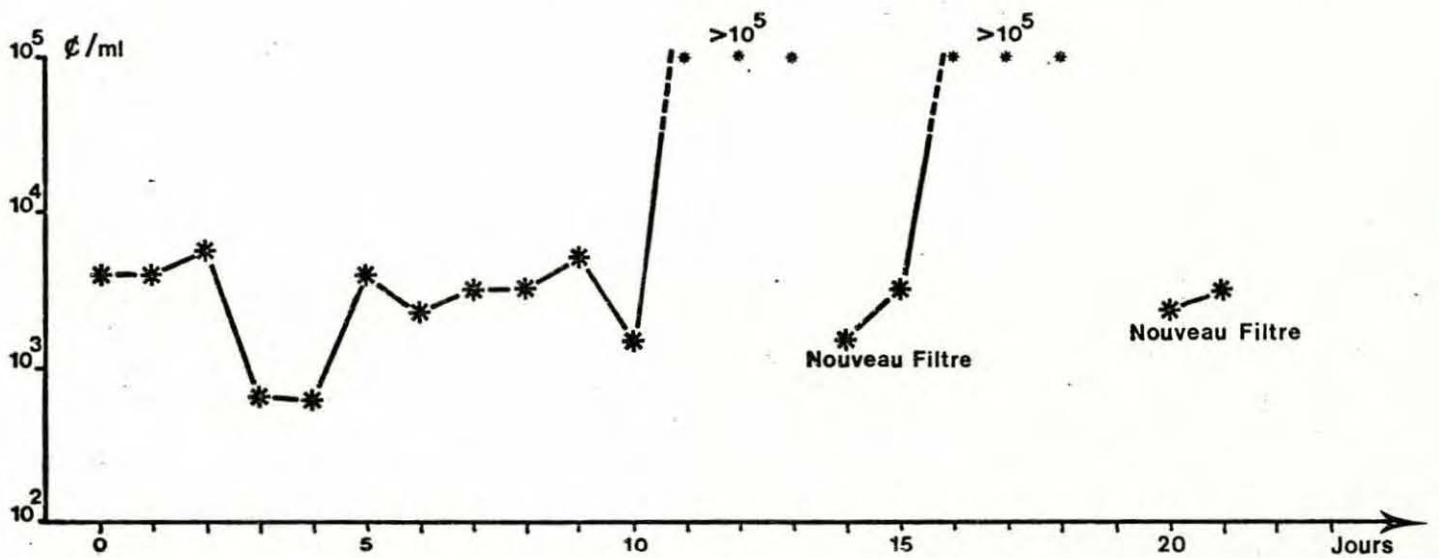


Fig.8: DANS L'EAU DE MER FILTREE

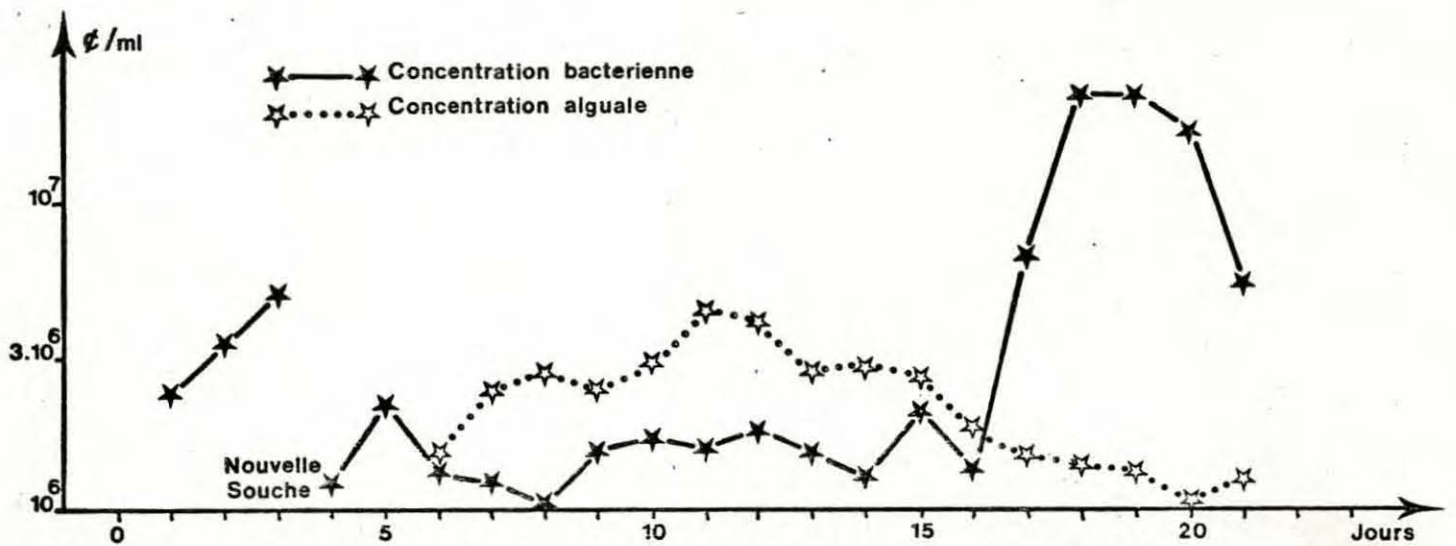


Fig.9: DANS LES CULTURES DE TETRASELMIS SUECICA

des *Artemia* par rapport à un élevage effectué dans des conditions physico-chimiques normales. Cet essai n'ayant apporté que très peu de renseignements, les comptages bactériens et le comportement des *Artemia* ayant une évolution comparable à celle de l'élevage normal, nous avons abandonné au 7^e jour les apports d'ammoniaque et de nitrites si bien que le bac II se retrouve dans les mêmes conditions physico-chimiques et de nutrition que le bac I.

3.2.1. Numération bactérienne.

3.2.1.1. Dans les élevages d'*Artemia salina* :

Les courbes de numération bactérienne des différents bacs présentent un profil identique à celui de la première expérience, mais avec des accidents très importants (Fig. 7).

Nous obtenons, comme dans les premiers essais, une phase de colonisation sur quatre à cinq jours, suivie d'une phase de décroissance présentant de multiples accidents, le nombre de bactéries ne se stabilisant jamais. Il est important de remarquer que la concentration est en général très supérieure à celle rencontrée durant les expériences précédentes.

3.2.1.2. Dans l'eau de mer filtrée :

L'eau de mer a fait l'objet d'une surveillance attentive car bien que les élevages soient réalisés sans renouvellement, il existe un apport quotidien d'eau de mer filtrée pour équilibrer la concentration alguale au moment de l'apport de nourriture. Ainsi les élevages effectués dans des aquariums de 20 litres, débutent avec seulement 1 à 1,5 litre pour environ 40 000 larves et se terminent avec 15 à 18 litres pour 2 500 à 5 000 *Artemia*.

L'eau de mer utilisée passe préalablement dans un système de filtration comportant deux filtres : le premier étant de 10 μ et le dernier de 0,3 μ . Théoriquement, peu de bactéries peuvent traverser ce système, mais la moindre petite déchirure dans le dernier filtre peut réduire à néant l'efficacité de la filtra-

tion, sans pour autant que l'on s'en aperçoive. Les comptages bactériens quotidiens ont permis de montrer d'une part la grande efficacité du système de filtration et d'autre part l'opportunité du changement des filtres lors de leur rupture (Fig. 8).

Ces apports d'eau de mer filtrée ont plusieurs conséquences sur les populations bactériennes de l'élevage :

- . Ils apportent les nutriments nécessaires au maintien de certaines souches bactériennes et quand les volumes sont importants, ils peuvent permettre une nouvelle phase exponentielle de croissance de souches qui trouvent dans cette eau tous les éléments nécessaires à leur parfaite croissance.

- . Ils apportent en cas de rupture de filtres une biomasse bactérienne qui peut, en concentration, être supérieure à celle de l'élevage.

- . Ces apports d'eau de mer sont une voie de pénétration pour des nouveaux germes. Ainsi après les déboires dus au "germe migrant" durant la première série d'expériences, tous les aquariums et récipients ont été passés à l'eau de javel. Pourtant le germe s'est de nouveau manifesté le 6e jour dans le bac I et sa présence dans l'eau de mer filtrée a été mise en évidence le 7e jour.

Certains accidents dans les courbes de numération bactérienne peuvent très bien être expliqués par les hypothèses précédentes. Ainsi dans le bac II, entre le 10e et le 11e jour, nous notons la brusque augmentation de la concentration bactérienne qui passe de 7×10^6 μ /ml à $2,94 \times 10^7$ μ /ml, soit 22 millions de germes de plus par millilitre. En recherchant dans les différentes manipulations effectuées le 10e jour, nous nous apercevons que le volume d'eau de ce bac a été doublé : il est passé de 3,4 litres à 6,9 litres. Par ailleurs, en plus de cet apport d'eau de mer fraîche qui favorise une nouvelle colonisation bactérienne, les comptages bactériens de l'eau de mer filtrée indiquent une rupture du système de filtration entre le 10e et le 11e jour ; cet incident a pu survenir durant les opérations de remplissage.

A partir du 15e et 16e jour, nous notons une autre brusque contamination, mais cette fois dans tous les bacs. Qualitativement, elle est l'oeuvre d'une souche dont les colonies sont de couleur jaune. Un comptage différentiel effectué dans le bac I illustre bien la prédominance de ce germe.

Tableau 4 : Comptage différentiel dans le bac I

Jour	Colonies jaunes	Autres colonies
15e	2 x 10 ⁶ bact./ml	3,5 x 10 ⁶ bact./ml
16e	5,9 x 10 ⁶ "	1,5 x 10 ⁶ "
17e	8 x 10 ⁶ "	0,34 x 10 ⁶ "
18e	1,1 x 10 ⁷ "	0,36 x 10 ⁶ "
19e	2,6 x 10 ⁷ "	0,7 x 10 ⁶ "
20e	6,8 x 10 ⁶ "	0,8 x 10 ⁶ "
21e	0,25 x 10 ⁶ "	0,67 x 10 ⁶ "

Deux causes peuvent expliquer l'envahissement simultané de tous les bacs : - ce germe peut très bien se trouver à l'état de vie ralentie dans tous les bacs et se développer brusquement à l'occasion d'un apport de nutrilites essentiels à sa croissance. Ceux-ci peuvent provenir soit de l'eau de mer filtrée soit de la culture d'algues qui présente justement à cette période de profondes modifications.

- La deuxième possibilité est un éventuel apport de ce germe par l'eau de mer filtrée ou une autre source contaminante qui, trouvant dans les élevages d'Artemia un milieu favorable à sa croissance, se développe de façon exponentielle.

3.2.1.3. Contamination par les oeufs d'Artemia :

Les oeufs d'Artemia fournis par METAFRAME (San Francisco Bay Brand Division, Newark, California) représentent la plus importante source de contamination au début de chaque expérience. En fait, il s'agit d'une souche de contamination

10 ml d'eau de mer stérile que l'on agite pendant 1 minute, nous obtenons après étalement immédiat sur milieu 2216 E de OPPENHEIMER & ZOBELL (1952) : $2,87 \times 10^4$ germes/ml.

A partir du tube de dilution -1 qui contient donc environ 2870 germes/ml au temps 0, nous obtenons : après 24 h = 1×10^7 bact./ml
après 48 h = $1,8 \times 10^7$ "

Bien que les jeunes larves avec lesquelles on ensemence les bacs d'expérience soient séparées de leur eau d'éclosion par une filtration grossière, nous obtenons une importante contamination bactérienne. En effet, l'eau de mer filtrée ne contient que 4×10^3 bact./ml avant l'expérience, et au temps 0, les élevages contiennent 5 à 6×10^5 bact./ml.

3.2.1.4. Dans les cultures de *Tetraselmis suecica* :

Les algues-fourrage que nous utilisons sont inévitablement une source de contamination bactérienne, car leur culture axénique est incompatible avec les volumes requis journallement pour les besoins des différents laboratoires du C.O.B. Pourtant la réussite de tout élevage utilisant ce type d'alimentation naturelle est sous l'étroite dépendance de la bonne qualité de celle-ci. CALABRESE & DAVIS (1970) ont montré que les cultures d'algues "bactérisées" peuvent devenir soudainement toxiques, sans que leur aspect et leur croissance en soient altérés. LUCAS & PRIEUR (1974) insistent sur le fait que pour la bonne conduite d'un élevage, on ne saurait tolérer la moindre négligence dans la surveillance bactérienne des algues-fourrage. La population bactérienne d'un élevage de Bivalves peut être doublée par l'apport des bactéries des algues (PRIEUR & LE ROUX, 1975).

Les algues étant certainement à l'origine des modifications physico-chimiques des élevages lors de la première série d'expériences, nous avons décidé pour celle-ci une étroite surveillance des apports en *Tetraselmis*. Une nouvelle culture en ballon nous a été fournie à partir du 4e jour pour les besoins de notre expérience, afin de suivre l'évolution des biomasses bactérienne et alguale au cours du temps.

Les résultats (Fig. 9) montrent que dans des conditions normales de croissance et de multiplication des cellules alguales, la biomasse bactérienne se maintient aux alentours de 10^6 g/ml, cette concentration étant inférieure à celle rencontrée dans les bacs d'*Artemia*.

Mais brusquement, le 17e jour, la biomasse bactérienne augmente pour atteindre $2,2 \times 10^7$ germes/ml les 18e et 19e jours. Dans le même temps on observe une chute de la concentration alguale, avec une perte de mobilité ciliaire dans le ballon de culture. Une souche bactérienne reconnaissable à ces colonies de couleur brune est isolée pour une étude qualitative car elle représente à ce moment 80% des germes présents dans les boîtes de Pétri.

Par un rapide calcul nous pouvons juger la contamination bactérienne par les algues de cette période : au 20e jour, dans le bac II, il y a $1,2 \times 10^6$ bact./ml, on apporte en nourriture 3 litres 415 de culture de *Tetraselmis* contenant $2,2 \times 10^7$ bact./ml, soit en tout $7,5 \times 10^{10}$ bactéries. En effectuant les calculs de dilution, le volume final devant être de 12,6 litres, on obtient dans ce bac après l'apport de nourriture, une concentration de $6,8 \times 10^6$ bact./ml, soit une augmentation de plus de 5 millions de bactéries par millilitre.

Cette nourriture est donnée à 16 h, le lendemain à 9 h il ne reste plus que $2,1 \times 10^6$ bact./ml. La disparition de cette biomasse bactérienne peut s'expliquer d'une part par la mort de germes n'ayant pas trouvé des conditions physico-chimiques idéales pour se maintenir, et d'autre part, par la prédation des *Artemia* qui ne recherchent pas spécifiquement des bactéries, mais qui en ingérant les cellules phytoplanctoniques, absorbent également les germes bactériens qui y sont agglomérés.

Nous observons ici un double inconvénient inhérent à la mauvaise qualité de la culture d'algues : celle-ci possède à la fois une forte concentration bactérienne pour une faible concentration alguale. Ceci implique que de grands volumes sont nécessaires pour nourrir les *Artemia* et par conséquent l'apport bactérien en est d'autant plus grand.

En reprenant l'exemple précédent, nous pouvons comparer ce qu'aurait été l'apport bactérien dans le cas d'une culture de *Tetraselmis* de bonne qualité (de concentration alguale de 4×10^6 μ /ml et de concentration bactérienne de 10^6 bact./ml).

Tableau 5

BAC II (20e jour)	Concent. alguale de la culture de <i>Tetraselmis</i> en μ /ml	Concent. bact. de la culture de <i>Tetraselmis</i> en bact./ml	Volume algual requis pour la nourrit. des Artemia	Apport total bactérien	Concent. bact. initiale dans le bac II	Concent. bact. après l'apport de <i>Tetraselmis</i> dans le bac II
Culture de <i>Tetraselmis</i> du 20e jour	1×10^6	$2,2 \times 10^7$	3 1 415	$7,5 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^6$	$6,8 \times 10^6$
Culture de <i>Tetraselmis</i> de bonne qualité	4×10^6	10^6	0 1 842	$8,4 \times 10^8$	$1,2 \times 10^6$	$1,18 \times 10^6$

Ce simple calcul montre l'importance des soins que l'on doit apporter aux cultures d'algues-fourrage que ce soit dans un but expérimental ou commercial, ainsi que la nécessité d'un contrôle bactérien journalier.

3.2.1.5. Autres contaminants :

Les contaminations par l'air et les opérateurs durant les différentes manipulations sont difficilement chiffrables. Toutefois une expérience a été tentée au niveau du plan de travail de bactériologie se situant sous une hotte aspirante. Une boîte de Pétri contenant du milieu 2216 E d'OPPENHEIMER & ZOBELL (1952) est laissée ouverte pendant 1 h le plus près possible du bec Bunsen.

Nous obtenons les résultats moyens suivants :

Hotte aspirante en marche = 15 colonies bact./heure + 13 champignons/heure
 Hotte aspirante inactive = 24 colonies bact./heure + 1 champignon /heure

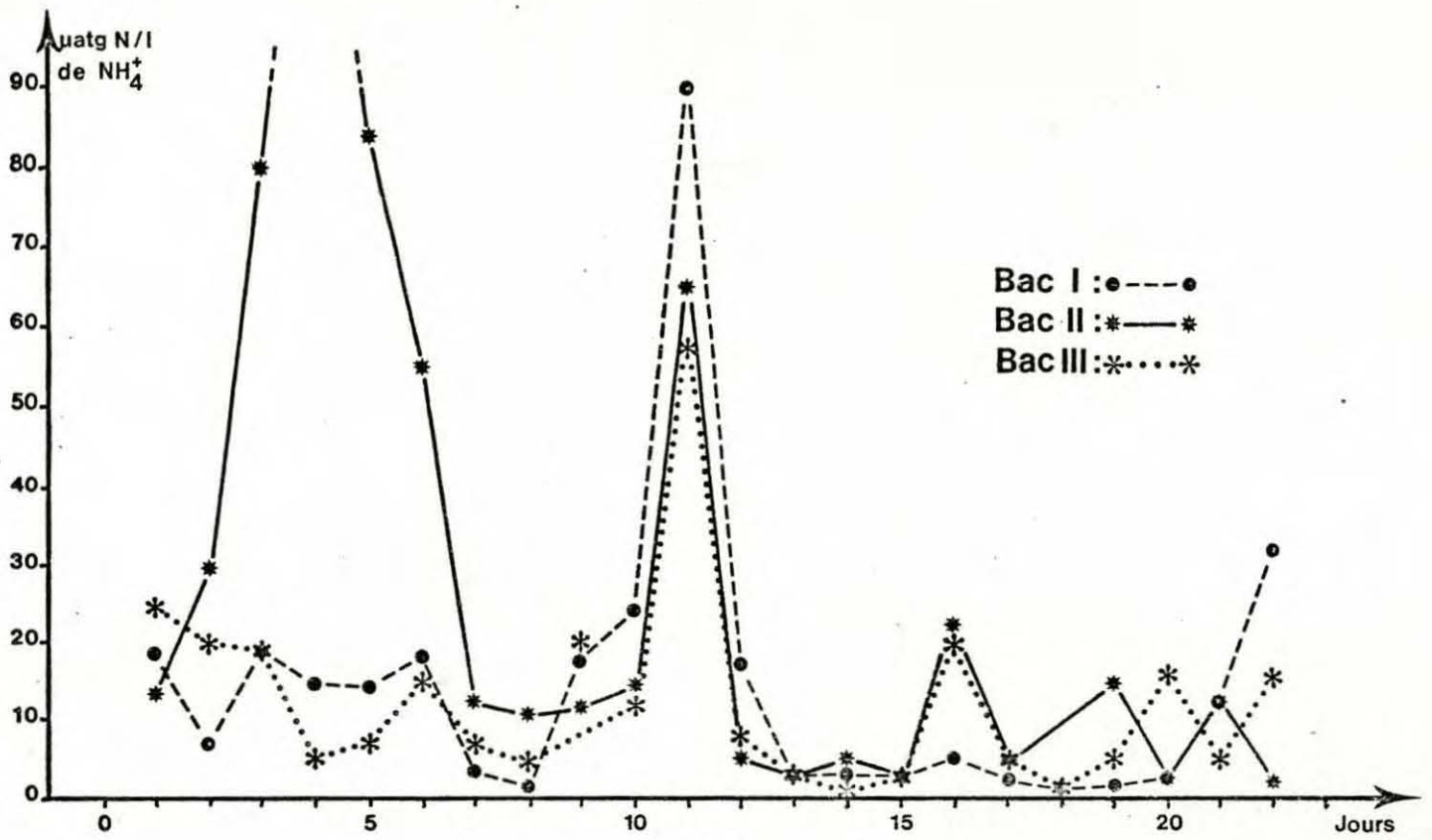


Fig.10:TENEURS EN IONS AMMONIUM

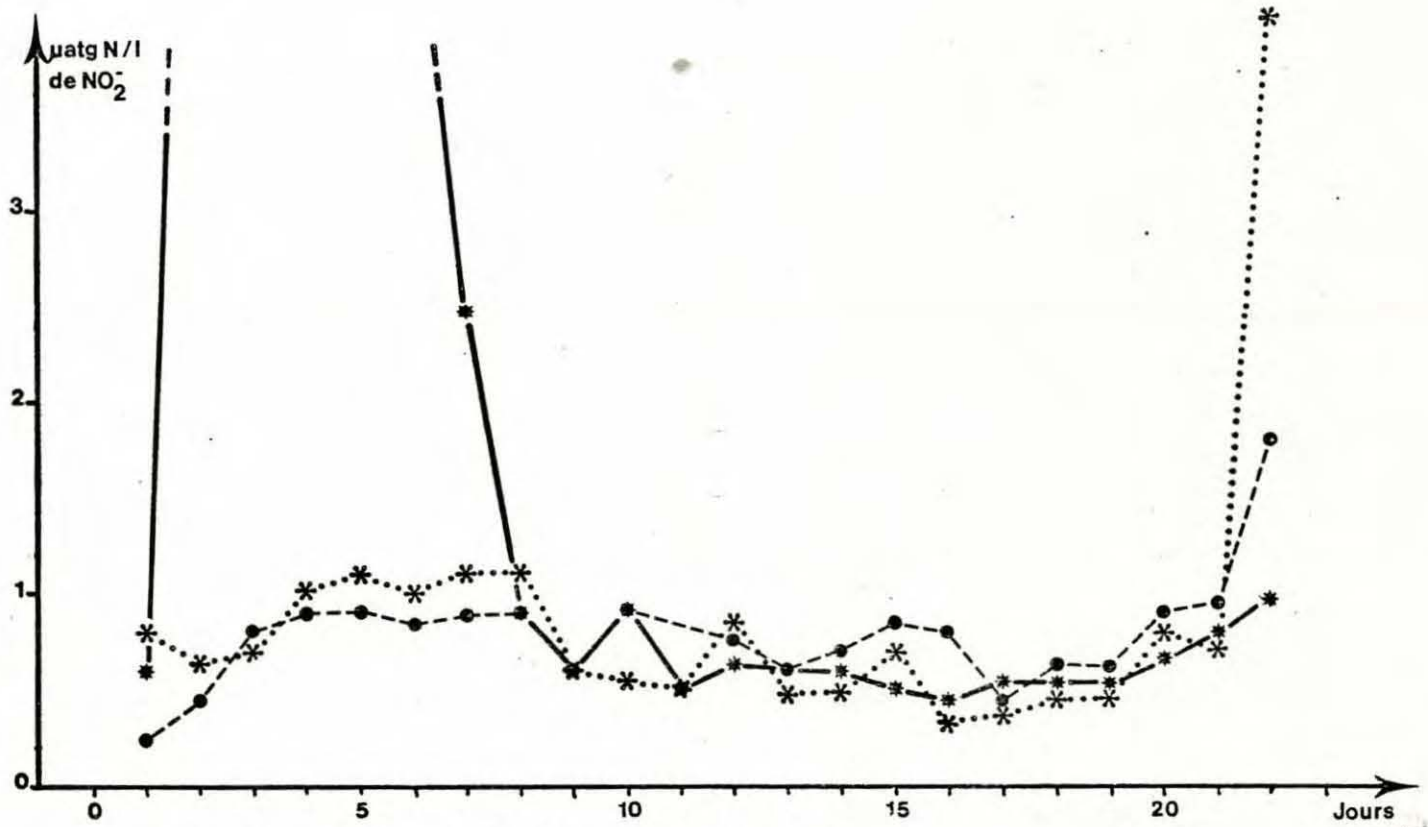


Fig.11: TENEUR EN NITRITES

Les champignons dans le premier cas ont également contaminé les étallements des échantillons effectués pendant ce temps. Il n'était donc pas recommandable d'utiliser la hotte pendant les opérations d'inoculation.

3.2.2. Observations au niveau des paramètres mesurés.

3.2.2.1. Ammoniaque et nitrites (Fig. 10 et 11)

Le bac II a été placé en excès d'ammoniaque et de nitrites afin d'étudier le rôle joué par les bactéries dans l'augmentation lors des premières expériences de ces éléments azotés et de vérifier que ces derniers n'ont pas eu d'incidence sur la croissance des *Artemia*.

L'ajustement en ammoniaque et nitrites a été fait de façon à obtenir les concentrations moyennes relevées dans les premiers élevages. Ces apports d'éléments azotés n'entraînent aucune variation quantitative notable des bactéries par rapport aux bacs I et III. Les *Artemia* ont un comportement normal et n'affectent aucun retard de croissance ; ils présentent d'ailleurs la plus grande taille moyenne au 7^e jour.

	<u>Bac I</u>	<u>Bac II</u>	<u>Bac III</u>
Taille moyenne au 7 ^e jour des <i>Artemia salina</i>	0,99 mm	1,08 mm	0,93 mm

Au 5^e jour, aucune modification n'ayant été notée dans le comportement et la morphologie des *Artemia*, les apports en ammoniaque et en nitrites ont été abandonnés. Le bac II se retrouve donc dans les mêmes conditions physico-chimiques et de nourriture que le bac I à partir du 8^e jour. Le retour aux concentrations normales est plus rapide pour l'ammoniaque que pour les nitrites, mettant ainsi en évidence une importante activité nitrifiante des bactéries : l'ammoniaque étant oxydé en nitrites, puis en nitrates.

Dans les bacs I et III dont les conditions chimiques n'ont pas été altérées et dans le bac II à partir du 8^e jour, les teneurs en ammoniaque et nitrites restent faibles. Seul le 11^e jour qui a été en partie jeûné, marque une brusque augmentation de la concentration en azote ammoniacal. Nous avons vu que ce phénomène ne peut être relié à une excrétion accrue des *Artemia* qui utilisent leurs protéines à des fins énergétiques.

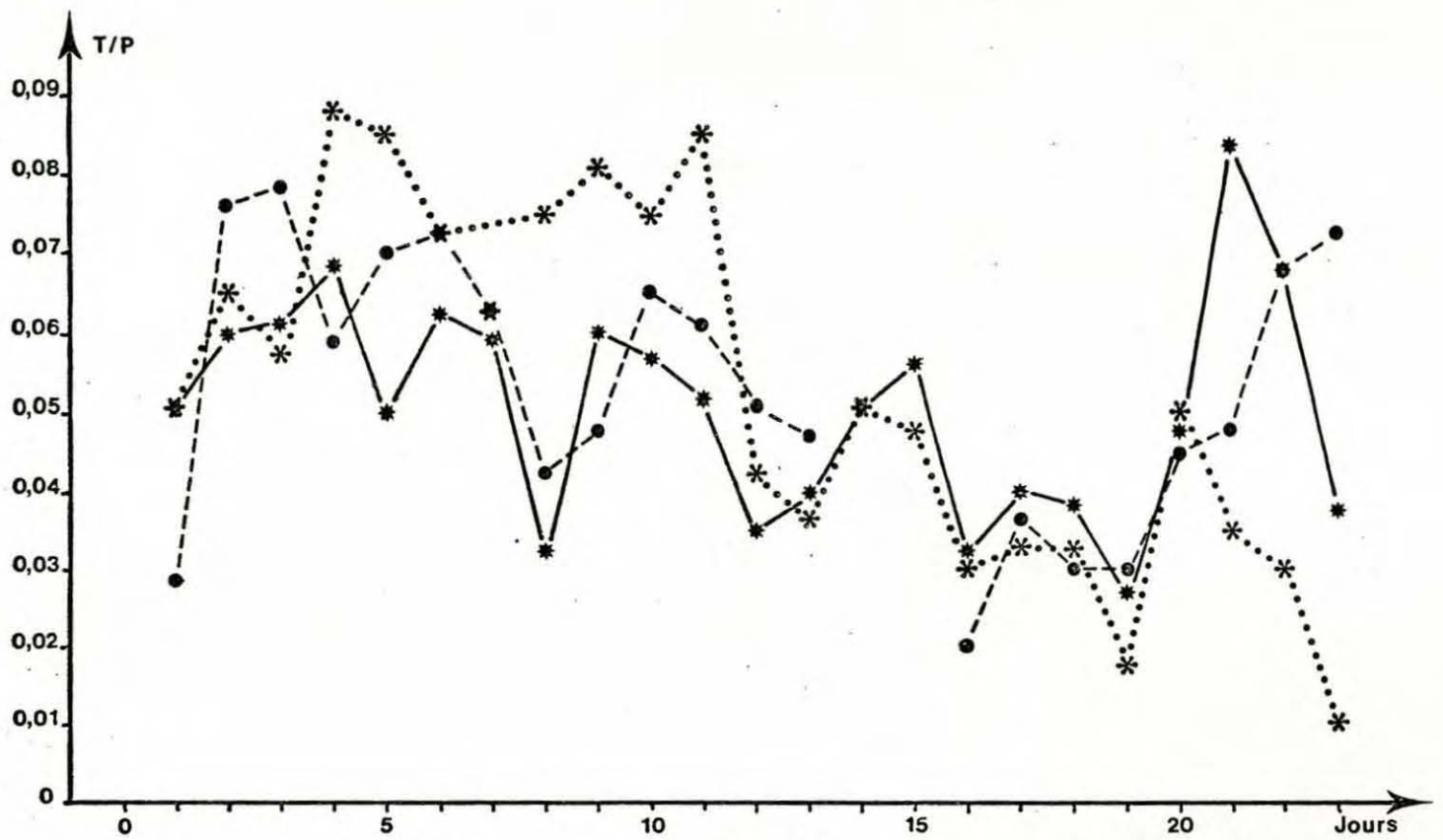


Fig.12:ACTIVITE TRYPSIQUE

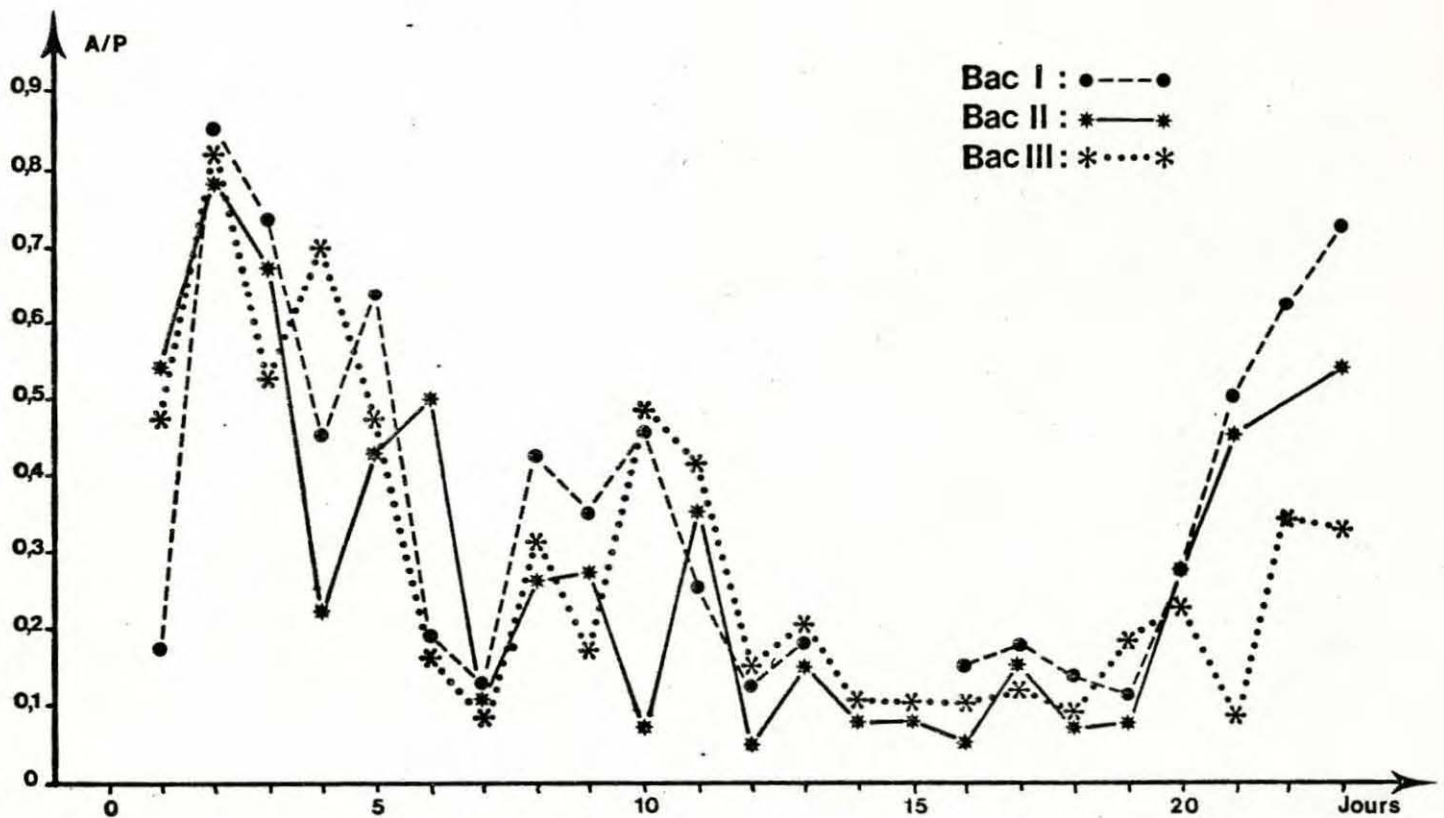


Fig.13:ACTIVITE AMYLASIQUE

Ce jour de jeûne et l'expérience en excès d'éléments azotés permettent de vérifier les hypothèses émises pour expliquer les taux anormaux d'ammoniaque et de nitrites enregistrés lors de la première série d'expériences. L'origine du phénomène semble bien être la mauvaise qualité de la culture d'algues qui, d'une part apporte des éléments nutritifs azotés non utilisés, et d'autre part, entraîne une orientation du métabolisme digestif des *Artemia* vers une digestion protéasique pour faire face à la déficience des réserves glucidiques des *Tetraselmis*. Par ailleurs, le jour de jeûne induit le catabolisme des protéines des *Artemia* qui s'accompagne d'une forte excrétion ammoniacale. Quant aux bactéries, elles contribuent à accroître la charge du milieu en éléments minéraux azotés en minéralisant les déchets organiques et en transformant l'ammoniaque ainsi obtenu en nitrites et en nitrates.

3.2.2.2. Activités enzymatiques des *Artemia salina* :

Dans l'ensemble, les activités enzymatiques (Fig.12 et13) sont moins stables que dans la première série d'expérience. Les courbes de résultats révèlent de multiples accidents difficilement interprétables. Il faut peut-être en rechercher la cause dans le fait que chaque valeur n'est ici le reflet que d'un prélèvement, alors que dans les expériences précédentes, elle représente la moyenne de cinq échantillonnages espacés dans la journée.

L'intensité de l'activité trypsique est beaucoup plus faible que dans l'expérience précédente, ce qui indique que les réserves glucidiques des *Tetraselmis* suffisent aux *Artemia* pour pallier à leurs besoins énergétiques.

Dans cette série d'expérience, le jour de jeûne n'entraîne pas de chute de l'activité amylasique et d'augmentation de l'activité trypsique ; aussi tout essai de corrélation entre les variations quantitatives des bactéries et les activités enzymatiques des *Artemia* est impossible.

Pour avoir une notion plus complète du rôle que peuvent jouer les bactéries en tant qu'apport nutritif éventuel pour les *Artemia*, il faut essayer d'évaluer la biomasse bactérienne et la comparer à la biomasse alguale.

3.3. Estimation de la biomasse bactérienne.

3.3.1. Préambule.

Les bactéries des écosystèmes aquatiques ont longtemps été étudiées uniquement dans leur rôle de minéralisation de la matière organique et de transformation des éléments nutritifs minéraux. Les bactéries interviennent dans tous les cycles des éléments chimiques de la matière vivante : le carbone, l'azote, le soufre, le fer. Mais parallèlement à cet aspect important de leur activité, certains chercheurs récemment ont porté leur attention sur l'importance des bactéries dans les chaînes alimentaires des communautés aquatiques.

Ainsi d'après WURTZ (1947), les Protozoaires, les Copépodes, les Ostracodes, les Rotifères, les larves de moustiques et probablement certains batraciens et poissons consomment des bactéries. ZHUKOVA (1963) mentionne par exemple que *Nereis diversicolor* peut très bien vivre 14 jours avec pour unique nourriture des bactéries et avec un accroissement de poids de 12,3 %. Par ailleurs, des expériences effectuées chez le Copépode *Calanipeda aqua dulcis* de la mer d'Azov montrent que le poids de bactéries consommées est égal à 1/5 de celui du phytoplancton.

TEZUKA (1971 et 1974) va encore plus loin dans ce type d'expérience ; il montre que *Daphnia pulex* peut très bien vivre uniquement nourrie avec des bactéries, mais elle est alors incapable de se reproduire. En 1974, il remarque que *Daphnia pulex* ne peut croître et se reproduire pendant plusieurs générations quand elle est uniquement nourrie avec *Paramecium caudatum* ; par contre, avec une nourriture mixte à base de paramécies et de bactéries, les daphnies se développent et se reproduisent très bien. Dans le même temps, toujours chez *Daphnia pulex*, TAUB & DOLLAR (1968) ont montré que ce Branchiopode d'eau douce ne peut se reproduire correctement quand il est nourri avec des cultures axéniques de *Chlorella* ou de *Chlamydomonas*. Ils présument qu'il existe des substances probablement bactériennes nécessaires à la reproduction normale des daphnies.

Il n'est pas nécessaire de multiplier les exemples pour montrer que le rôle des bactéries ne se limite pas à la dégradation et à la minéralisation des matières organiques. Ces microorganismes sont une source de nourriture non négligeable pour certaines espèces et parfois même indispensables à leur métabolisme.

3.3.2. Evaluation de la biomasse bactérienne.

Pour étudier les bactéries en tant que source de nourriture pour les Artemia, il faudrait faire une estimation de la biomasse et de la production bactérienne ainsi que quantifier l'importance de la prédation.

Les expériences que nous avons réalisées ne permettent pas le calcul de la production bactérienne et de la prédation par les Artemia ; toutefois, en utilisant les mêmes méthodes que pour les Artemia et les algues, il nous a été possible d'estimer la biomasse protéique des germes présents dans les élevages.

ZOBELL (1963) donne pour les bactéries marines un volume moyen de $0,2 \mu^3$, un poids humide de 2×10^{-10} mg pour une bactérie, un poids sec de 4×10^{-11} mg, dont 2×10^{-11} mg de carbone.

KUZNETSOV & ROMANENKO (1966) considèrent le volume moyen égal à $0,5 \mu^3$.

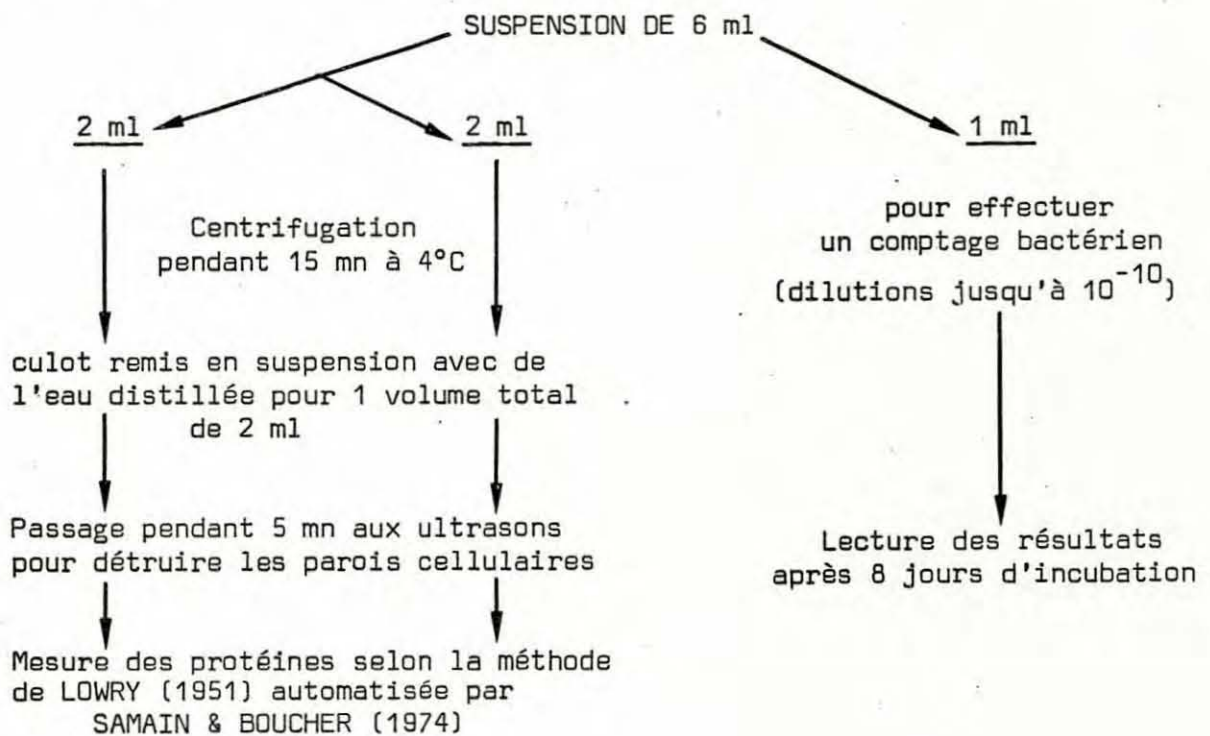
MORI & YAMAMOTO (1975) établissent leurs calculs de biomasse en considérant le volume moyen d'une bactérie à $0,5 \mu^3$, pour une densité voisine de 1, ils obtiennent un poids humide de $0,5 \times 10^{-9}$ mg/bactérie. Le poids sec représente 15 % du poids humide et la teneur en carbone correspond à la moitié du poids sec. La teneur en azote est obtenue par le rapport C/N = 50/8.

La recherche de la biomasse protéique bactérienne s'est fait selon la méthodologie suivante :

- Nous avons réalisé une suspension bactérienne dans le l'eau de mer stérile

en prélevant des colonies sur des étalements réalisés à partir d'échantillons des élevages d'Artemia.

- A partir de cette suspension, nous avons réalisé plusieurs ensemencements dans des boîtes de Pétri. Au bout de 24 heures, les germes sont en pleine phase exponentielle de croissance, toutes les cellules produites sont théoriquement viables. Nous réalisons alors une suspension bactérienne très concentrée dans un tube contenant 6 ml d'eau de mer stérile. Après une longue agitation permettant de supprimer les agrégats bactériens, nous utilisons la suspension comme suit :



Les résultats ont été les suivants :

1er test :	0,425 mg de protéines/ml) pour $2,37 \times 10^9$ bact./ml
	0,365 mg de protéines/ml	
2e test :	2,55 mg de protéines/ml) pour $1,64 \times 10^{10}$ bact./ml
	2,67 mg de protéines/ml	

Soit en moyenne :

pour le 1er test :	$1,66 \times 10^{-10}$ mg de protéines/bactérie
pour le 2e test :	$1,58 \times 10^{-10}$ mg de protéines/bactérie.

Ces deux tests ayant été effectués à 1 mois d'intervalle, nous pourrions estimer que ces résultats reflètent bien la biomasse protéique des bactéries des élevages d'*Artemia*. Cependant, en les comparant aux valeurs du poids sec données par les différents auteurs cités plus haut, ils semblent un peu trop élevés.

Plusieurs raisons peuvent expliquer cette divergence :

. Tout comptage bactérien par une méthode indirecte donne un résultat par défaut. Ici les germes en suspension étaient tous capables de croître sur le milieu d'OPPENHEIMER & ZOBELL (1952) puisque les cellules mères ont été prélevées sur ce même milieu. Par contre, il existe toujours une légère erreur due aux agrégats bactériens et aux germes qui restent collés sur l'étaloir.

. Par ailleurs, les germes sont considérés au départ de l'expérience comme tous viables, or il est certain qu'il existe un nombre plus ou moins important de cadavres cellulaires qui n'interviennent pas dans le comptage bactérien, mais dont les protéines sont mesurées.

Critique de l'expérience : La mesure des protéines selon la méthode de LOWRY (1951) automatisée par SAMAIN & BOUCHER (1974) est certainement très fiable et peut permettre d'avoir une estimation de la biomasse protéique des bactéries. Toutefois, la méthode indirecte de numération bactérienne n'est pas recommandable pour une telle recherche ; un comptage direct au microscope est nécessaire car les cellules vivantes et mortes ont un rôle équivalent dans le dosage des protéines.

3.3.3. Discussion.

Malgré ces résultats peu satisfaisants, nous pouvons essayer de comparer les biomasses protéiques bactérienne et alguale. Pour cette dernière, les analyses effectuées au C.O.B. montrent que les *Tetraselmis suecica* ont un fort rapport C/N comparé aux données trouvées dans la bibliographie pour des espèces voisines. Mais ce rapport varie beaucoup suivant les conditions de culture des algues et l'âge de celles-ci. (tableaux 6 et 7).

Tableau 6 : Biomasse alguale

Sources	Espèces	mg C/ μ	mg N/ μ	C/N	Protéines mg/ μ
PARSONS <i>et al.</i> 1961	<i>Tetraselmis maculata</i>	$8,35 \times 10^{-8}$	$1,88 \times 10^{-8}$	4,44	$1,18 \times 10^{-7}$
BERLAND <i>et al.</i> 1972	<i>Tetraselmis striata</i>	$6,11 \times 10^{-8}$ $1,98 \times 10^{-8}$	$1,37 \times 10^{-8}$ $6,14 \times 10^{-9}$	4,45 3,24	
C.O.B. 1976	<i>Tetraselmis suecica</i>	1×10^{-7} $7,23 \times 10^{-8}$ $4,69 \times 10^{-8}$	$6,4 \times 10^{-9}$ $6,47 \times 10^{-9}$ $4,34 \times 10^{-9}$	15,6 11,17 10,08	$2,4 \times 10^{-8}$

Tableau 7 : Biomasse bactérienne

Sources	Poids brut mg/ μ	Poids sec mg/ μ	mg C/ μ	mg N/ μ	Protéines mg/ μ
ZOBELL 1963	2×10^{-10}	4×10^{-11}	2×10^{-10}		
HUSSENOT 1972	5×10^{-10}	1×10^{-10}	5×10^{-11}		
YAMAMOTO 1975	5×10^{-10}	$0,75 \times 10^{-10}$	$3,75 \times 10^{-11}$	6×10^{-12}	
C.O.B. 1976		" $3,2 \times 10^{-10}$ "	si 50% de protéines		$1,60 \times 10^{-10}$

Les cellules bactériennes ont une composition chimique très variée ; on trouve en général, par rapport au poids sec, 35 à 75% de protéines, 10 à 30% de glucides (surtout dans la paroi) et 15 à 25% d'acides nucléiques. Si nous prenons le pourcentage moyen de 50% de protéines, nous avons un poids sec calculé de $3,2 \times 10^{-10}$ mg par bactérie, ce qui est relativement plus élevé que les différentes données bibliographiques.

En utilisant nos résultats, nous avons au moment de l'apport de nourriture aux Artemia :

3×10^5 \varnothing algues/ml	soit	7,20 μ g de protéines/ml
pour 10^6 \varnothing bact. /ml	on a	0,16 μ g de protéines/ml
pour 2×10^7 \varnothing bact. /ml	on a	3,20 μ g de protéines/ml

Même en minorant ces résultats, nous voyons que la biomasse protéique bactérienne dans le milieu, comparée à celle des algues, est loin d'être négligeable, surtout que le "grazing" entraîne la disparition de 90 à 100% du phytoplancton au bout de 24 heures. Les bactéries (selon leur concentration) sont donc rapidement une source de nourriture protéique de biomasse équivalente ou supérieure à celle des algues.

De plus, il faudrait tenir compte de la production bactérienne, car jusqu'à présent nous n'avons calculé que la biomasse protéique des bactéries vivantes dans le milieu, sans tenir compte du renouvellement qui compense la disparition d'un grand nombre de germes par prédation ou décomposition dans le milieu. A ce sujet, ZHUKOVA (1963) signale que le Copépode *Calanipeda aqua dulcis* dans la mer d'Azov ingère en moyenne 290 000 bactéries par 24 heures pour 6 900 cellules phytoplanctoniques : soit en biomasse (poids brut) 5 fois plus de phytoplancton que de bactéries.

Il est malheureusement impossible d'établir des taux de production dans une telle expérience, le temps de génération des bactéries variant de quelques minutes à plusieurs mois selon les espèces, la température et le substrat. Toutefois ZOBELL (1963) signale que le temps de génération des bactéries

dans une eau de mer naturelle stockée à 22°C dans un volume de 20 l environ, est de 3 à 6 heures pendant les deux premiers jours ; ensuite, il y a une diminution progressive dépendante des facteurs du milieu. Dans le bac I, le temps de doublement de la population est de 4 h 15 mn le premier jour, et de 8 h 30 mn dans le bac II ; à partir du deuxième jour, il y a une diminution considérable dans les deux bacs de ces temps de génération. Mais ceux-ci ne sont en fait "qu'apparents" puisqu'il n'est pas possible de tenir compte de la prédation et leurs diminutions observées dès le 2e jour sont peut être à relier à une absorption des bactéries par les Artemia.

3.4. Expériences en conditions physico-chimiques altérées.

3.4.1. Chocs thermiques.

A partir des adultes prélevés dans le bac I de l'expérience précédente, nous avons réalisé une série de chocs thermiques de longue ou de courte durée. Les seuls paramètres mesurés étant la température, les activités enzymatiques des Artemia et le nombre de bactéries.

Les Artemia, au nombre de 300, sont placés dans un bécher de 2 litres contenant de l'eau de mer filtrée. Trois récipients sont ainsi préparés, dont l'un est conservé à la température ambiante de 22°C, le deuxième est amené à 37°C pendant 30 minutes et le dernier subit un choc thermique long à 34°C pendant 7 heures ; les retours à la température ambiante se font lentement. Les élevages sont réalisés en lumière naturelle et 5 mn après le début de l'expérience, on apporte 100 ml d'algues dans chaque bécher.

Les comptages bactériens (fig.14) révèlent dans les deux cas (choc long à 34°C et choc court à 37°C) une colonisation du milieu peu différente

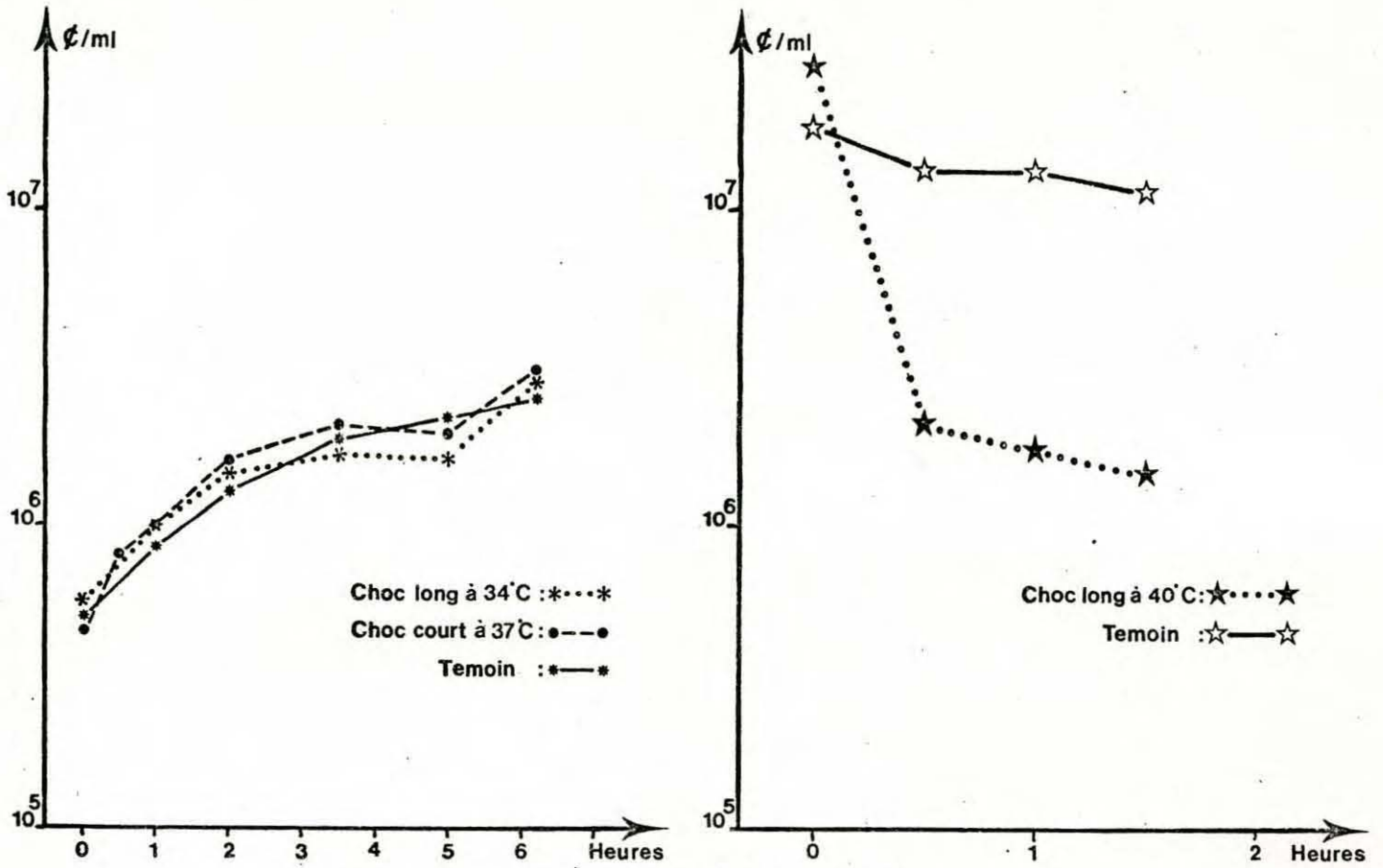


Fig.14: NUMERATION BACTERIENNE

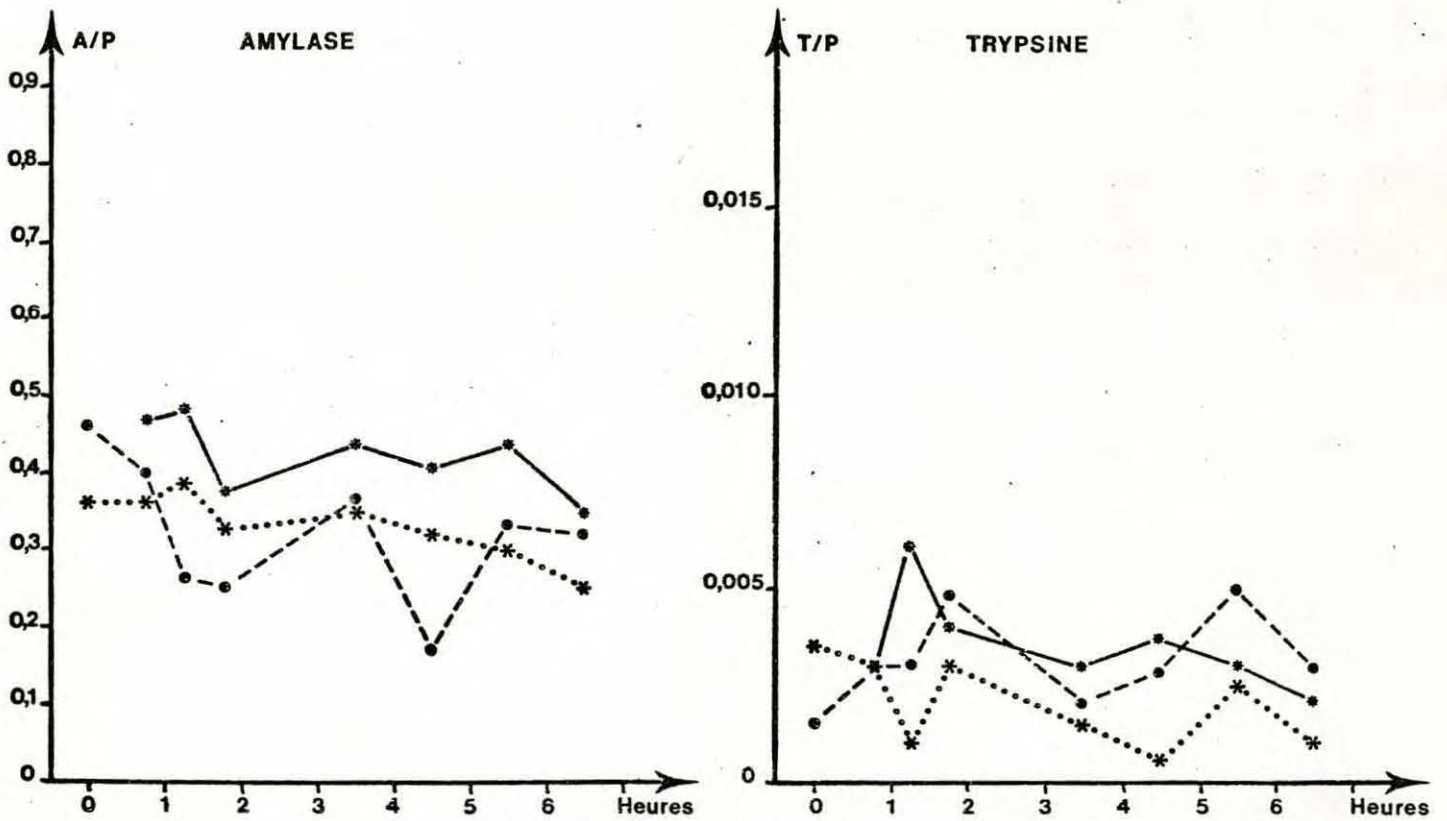


Fig.15: ACTIVITE ENZYMATIQUE

du témoin. Ces températures ne semblent pas faire varier quantitativement les bactéries, mais il peut y avoir des modifications qualitatives car certaines souches bactériennes sont affectées dès 30°C (PRIEUR, 1974).

Du point de vue enzymatique (fig.15), l'activité trypsique ne subit pas de variations significatives. Seule l'activité amylasique du lot placé à 37°C pendant 30 minutes montre, immédiatement après le choc thermique, une baisse plus importante que dans le témoin et le choc long à 34°C. Toutefois les variations ne sont pas très importantes et il est difficile de tirer des conclusions, les Artemia semblant peu affectés par ces variations de température.

Dans une expérience ultérieure, en effectuant un choc long à 40°C à partir d'Artemia conservés dans leur eau d'élevage, nous avons obtenu un résultat intéressant du point de vue bactérien, mais la mort rapide des Artemia a compromis l'étude enzymatique. Toutefois le nombre des bactéries en une heure et demie d'expérience a accusé une chute sensible, signifiant que, dans un milieu déjà colonisé, certaines souches sont incapables de se maintenir à une telle température. Il est possible qu'un choc long à 37°C entraîne le même effet.

3.4.2. Pollution cuivrique.

Cette expérience présente le double intérêt d'étudier les réactions des Artemia à des pollutions croissantes en cuivre et de suivre la réaction de la microflore bactérienne pour laquelle le cuivre est un agent bactéricide ou bactériostatique car il interfère avec le métabolisme producteur d'énergie en se combinant avec les protéines et, par conséquent, en inactivant les enzymes (STANIER *et al.*, 1966).

Le cuivre est donc un inhibiteur enzymatique au même titre que les autres métaux lourds (mercure, argent, plomb...) ; toutefois, le plus efficace d'entre eux est le mercure. Ces métaux lourds se combinent avec les groupes sulfhydryles (SH) des protéines cellulaires et ont pour effet de provoquer une

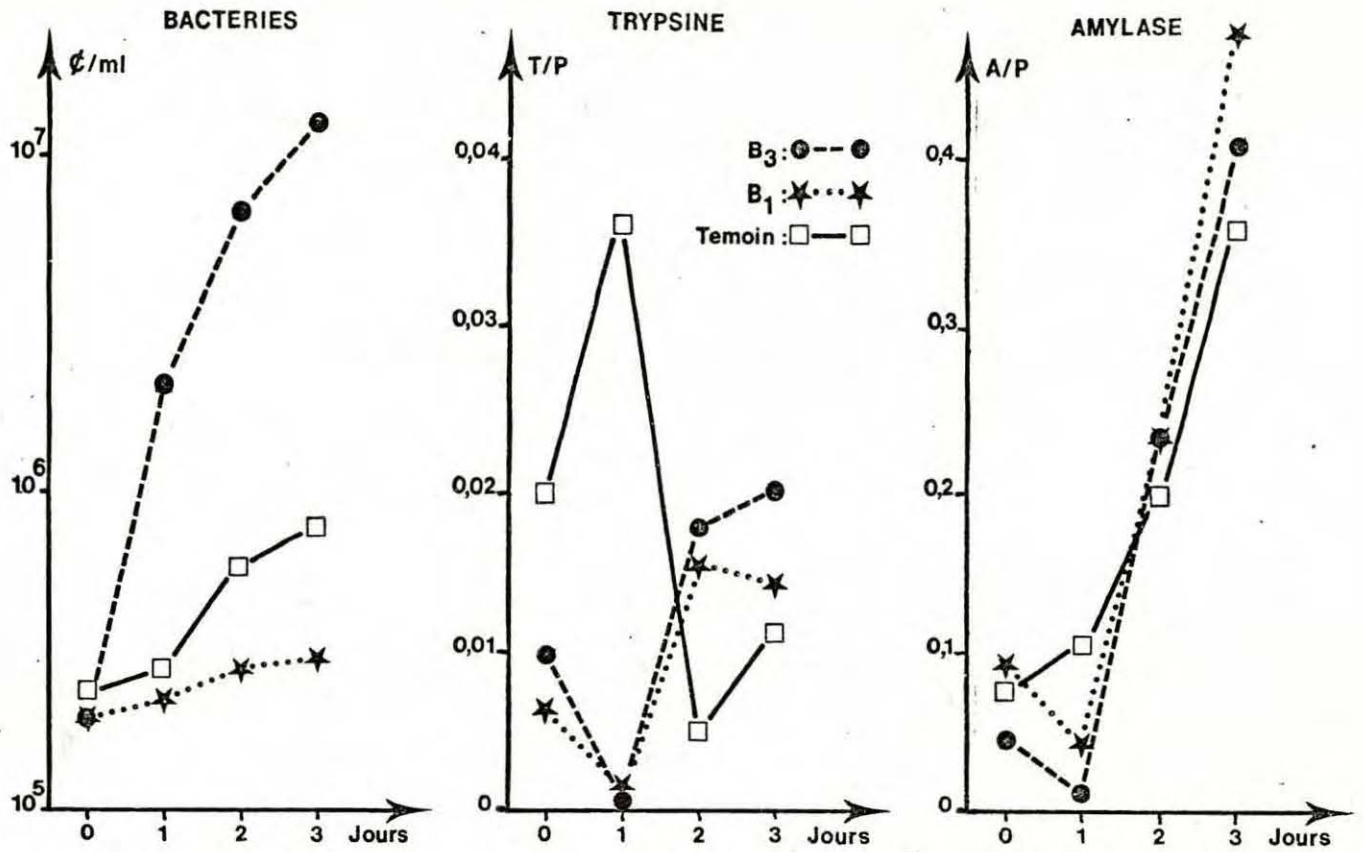


Fig.16: POLLUTION CUIVRIQUE (1^{ère} exp.)

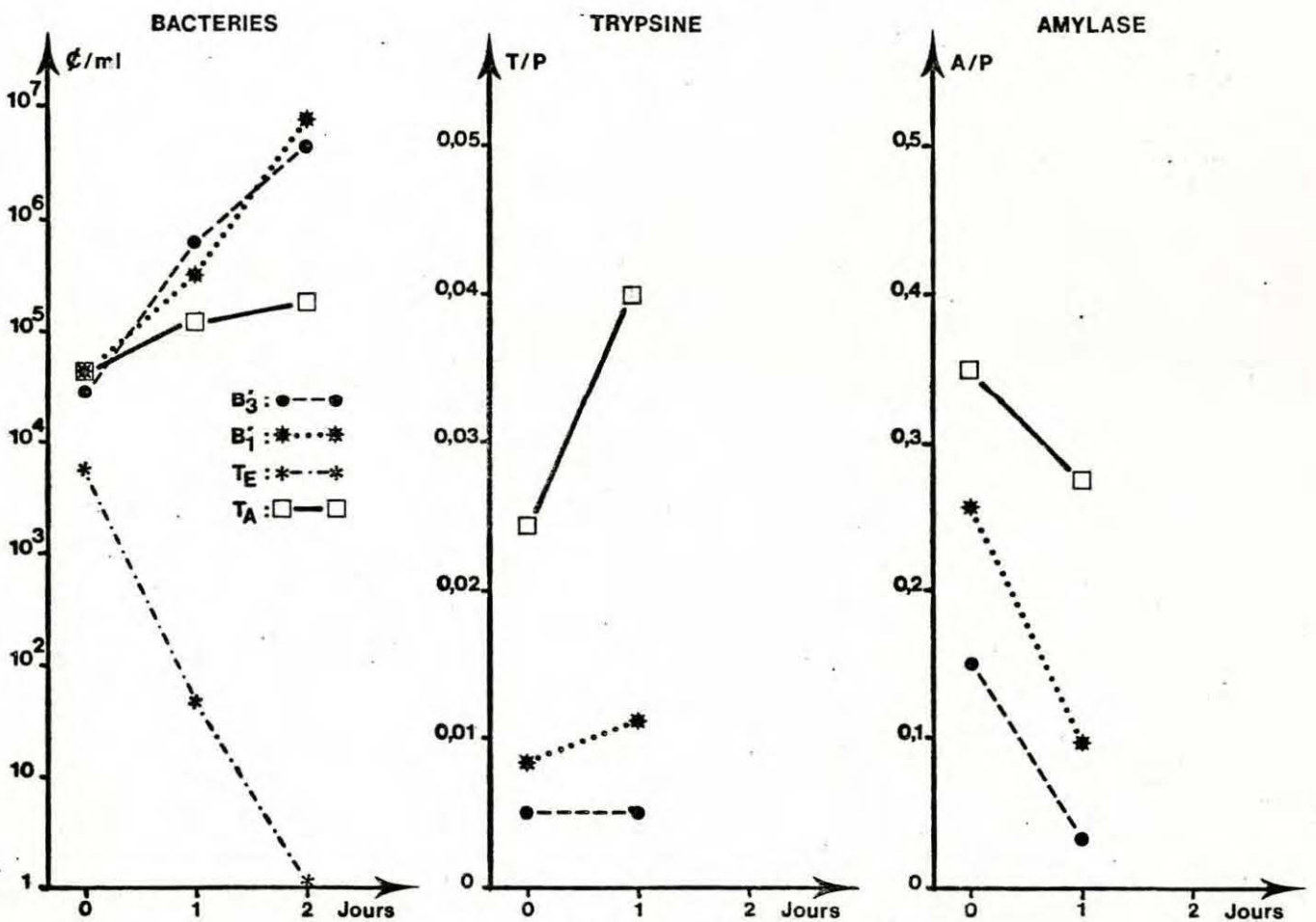


Fig.17: POLLUTION CUIVRIQUE (2^è exp.)

altération générale du métabolisme. Mais bien que ces composés soient des agents toxiques très puissants, leurs effets peuvent -dans certaines limites- être supprimés par l'addition de composés contenant des groupes sulfhydryles comme la cystéine et le glutathion (STANIER *et al.*, 1966).

Nous n'avons pas trouvé de données précises sur les taux de cuivre considérés comme toxiques pour les bactéries ; toutefois, ALBRIGHT & WILSON (1972) montrent que des teneurs de 10 ppb de Cu^{2+} entraînent une inhibition partielle de l'activité hétérotrophique des bactéries. Les concentrations employées lors de nos expériences sont de 1 à 3 ppm.

La première expérience a été effectuée avec des Artemia conservés dans leur eau d'élevage. L'adjonction de cuivre se fait sous forme de sulfate de cuivre et les doses ajoutées sont immédiatement contrôlées par une analyse chimique.

Trois béciers de 3 litres, exposés à la lumière naturelle, reçoivent respectivement :

- 3,5 ppm de Cu bac B₃
- 1,4 ppm de Cu bac B₁
- 0 ppm de Cu bac témoin

Six heures après l'adjonction de cuivre, 100 ml d'algues sont ajoutés ; nous observons alors un comportement énigmatique des Artemia qui se regroupent au fond du bécier à l'opposé de la lumière uniquement dans le bac témoin.

Au bout de 24 heures, dans l'élevage contenant 3,5 ppm de Cu (B₃) nous observons quelques cadavres et une eau beaucoup plus trouble que dans le témoin et le bac B₁. L'augmentation de la turbidité de l'eau peut être reliée à celle de la biomasse bactérienne. (Fig. 16).

48 heures après le début de l'expérience, la mortalité est très élevée dans le bac B₃ et légère dans le bac B₁. Le trouble de l'eau de l'élevage

à 3 ppm de Cu s'accroît, toujours en relation avec l'augmentation de la biomasse bactérienne.

Le 3e jour, l'expérience est arrêtée : un prélèvement d'eau révèle que dans le bac B₁ la concentration du cuivre dans l'eau est passée de 1,4 ppm à 1 ppm et dans le bac B₃ de 3,5 ppm à 1,4 ppm.

Du point de vue enzymatique, nous ne notons pas de différence significative entre les différents bacs, sauf peut-être pour le 2e jour où les activités enzymatiques sont plus faibles dans les bacs contaminés ; mais ce phénomène est compensé, par la suite, par une activité plus intense.

Du point de vue bactérien, quantitativement nous avons noté une concentration inférieure dans le bac B₁ par rapport au témoin et un accroissement très important des germes dans le bac le plus pollué ; mais qualitativement, nous avons observé la disparition rapide de presque tous les germes présents au début d'expérience, seules des souches qui forment de grosses colonies blanches dans les boîtes de Pétri ont colonisé le milieu.

Cette dernière observation permet de faire l'hypothèse de la présence de souches résistantes au cuivre, tandis que la plupart des germes présents sont éliminés. Ainsi la "souche migrante" responsable de nos déboires en début d'étude, disparaît dans le bac B₃ en moins de 24 heures.

La deuxième expérience a pour but de vérifier les hypothèses émises lors du test précédent. Les Artemia sont placés cette fois-ci dans de l'eau de mer filtrée et répartis dans 4 béciers dont la composition est la suivante :

	Bac B' ₁	: Artemia + eau de mer filtrée + 1 ppm Cu
	Bac B' ₃	: Artemia + eau de mer filtrée + 3 ppm Cu
Témoins	Bac T _A	: Artemia + eau de mer filtrée
	Bac T _E	: eau de mer filtrée + 3 ppm Cu

Le comportement des Artemia est identique à celui de la première expérience, à savoir que dans le témoin (T_A), après addition de la nourriture, les Artemia se concentrent au fond du béccher à l'opposé de la lumière.

Après 24 heures d'expérience, nous observons déjà 50% de mortalité dans le bac B'_1 et 90% dans le bac B'_3 et l'eau des élevages est très trouble. Au bout de 48 heures, la quasi totalité des Artemia sont morts dans le bac B'_3 et environ 70% dans le bac B'_1 .

Du point de vue enzymatique, seuls deux prélèvements par bac ont pu être réalisés, les renseignements sont donc peu significatifs ; toutefois, nous observons une chute des activités enzymatiques par rapport au témoin (T_A).

Les bactéries, tant dans le bac B'_1 que B'_3 , parallèlement à l'augmentation de la turbidité de l'eau, montrent un accroissement considérable par rapport au témoin T_A . De plus, dans le témoin (T_E) contenant de l'eau de mer filtrée et 3 ppm de cuivre, nous observons la disparition progressive et complète de tous les germes en 48 heures. Du point de vue qualitatif, les souches bactériennes présentes dans B'_1 et B'_3 forment toutes de grosses colonies blanches dans les boîtes de Pétri, colonies identiques à celles observées lors de la première expérience. (Fig. 17).

Un comptage différentiel de ces colonies dans B'_1 révèle qu'elles représentent :

35%	des souches présentes au temps t_0
93%	après 6 heures
100%	après 24 heures
100%	après 48 heures

Dans B'_3 elles représentent :

46%	des souches au temps t_0
39%	après 6 heures
50%	après 24 heures
100%	après 48 heures

Nous pouvons penser que ces germes sont intimement liés à la présence des Artemia dans le milieu et à leur mortalité. En effet, lors de la première expérience, la dose de 1 ppm de cuivre ne s'était pas révélée aussi toxique pour les Artemia : les germes bactériens étaient alors moins nombreux dans ce bac que dans le témoin ; par contre, nous assistons, dans ce deuxième test, à une forte augmentation de la biomasse bactérienne que l'on peut relier à l'accroissement du nombre de cadavres dans le milieu.

La toxicité du cuivre envers les bactéries est très nettement prouvée par le témoin T_E, mais en présence de déchets organiques, certains germes sont capables de se développer, même en présence de fortes concentrations de cuivre.

Pour les Artemia, les doses de cuivre testées, bien qu'entraînant une mortalité élevée, ne semblent pas troubler fortement la synthèse des enzymes digestives. Quant à la différence de toxicité des mêmes doses de sulfate de cuivre entre les deux expériences, plusieurs explications sont possibles :

. Les lots d'adultes ayant servis aux deux expériences ne proviennent pas du même élevage ; le premier lot a fait l'objet d'un élevage contrôlé, le deuxième non. SALIBA & AHSANULLAH (1973) ont montré que des Artemia acclimatés à de faibles doses de cuivre résistaient mieux à la toxicité de fortes doses. Des lots d'origine diverse peuvent très bien posséder une tolérance différente envers le cuivre.

. Les milieux sont différents au départ, puisque la première expérience se déroule avec des Artemia dans leur eau d'élevage et la deuxième dans de l'eau de mer filtrée. L'eau de mer des Artemia contient de nombreux déchets organiques, des bactéries et des algues susceptibles d'absorber une partie du cuivre et, en particulier, la présence de protéines ou d'acides aminés comme la cystéine, le glutathion ou l'albumine qui peuvent capter sur leurs groupements sulfhydryles des ions cuivriques. L'eau de mer filtrée qui est utilisée dans la deuxième expérience ne contient que très peu de corps susceptibles d'absorber une partie du cuivre, si bien que l'action toxique de celui-ci, pour une même concentration, est plus intense pour les Artemia dans le deuxième test que dans le premier.

3.5. Essai d'amélioration de la qualité des cultures d'algues.

Nous avons déjà longuement insisté sur le rôle prépondérant joué par les "algues-fourrage" dans les élevages expérimentaux, ou dans les écloseries, nurseries et tout autre établissement faisant appel à ce type de nourriture.

Devant les déboires survenus aux cultures de *Tetraselmis suecica* durant nos expériences, nous nous sommes proposés d'effectuer une surveillance quantitative de la microflore bactérienne et une exploration qualitative d'une souche isolée lors des incidents survenus aux cultures.

L'inoculum de la culture de *Tetraselmis suecica* provient du Laboratoire de Biologie Marine de PLYMOUTH, il n'était pas garanti "bacteria-free". Un comptage bactérien révèle qu'il contient environ 10^8 germes/ml, ce qui semble trop élevé pour la bonne conservation de la souche alguale. Le même contrôle effectué par PRIEUR (1976, comm. pers.) sur la demande du Laboratoire d'Aquaculture du C.O.B., donne un résultat de $1,7 \times 10^8$ bactéries/ml ; ce qui est pour lui, la plus forte valeur qu'il ait rencontré dans une souche alguale.

L'idéal bien entendu, est l'obtention d'un inoculum véritablement axénique pour démarrer les cultures. Ensuite, les volumes requis journalièrement pour les besoins des différents laboratoires du C.O.B., rendent impossible la conservation de cet axénisme. Les techniques d'épuration généralement employées font appel aux antibiotiques (SPENCER, 1952 - BEDNARZ, 1972). Mais ceux-ci sont d'un emploi délicat dans les élevages et de nombreux chercheurs sont contre leur utilisation systématique qui peut aboutir à la sélection de souches antibio-résistantes ou même avoir une action néfaste sur les organismes en élevage. LUCAS & PRIEUR (1974) insistent sur le fait que l'emploi de ces antibiotiques réclame une connaissance approfondie de la microflore de l'élevage et que leur utilisation doit être judicieuse et modérée.

Nous avons donc recherché une méthode simple permettant de rendre la souche de *Tetraselmis* axénique, tout en ne faisant pas intervenir de bactéricides. L'équipe aquaculture du C.O.B. avait déjà réalisé des milieux gélosés sur lesquels ils faisaient croître un faible volume d'une culture alguale contaminée. Après incubation sous une lumière artificielle, ils prélevaient les colonies alguales formées pour les placer dans des tubes contenant une eau de mer nutritive stérile.

Ces essais se sont avérés infructueux pour l'unique raison que le milieu gélosé employé était celui de WALNE (1966), habituellement utilisé pour enrichir l'eau de mer des cultures d'algues, auquel on avait additionné de la gélose. Les germes bactériens, bien que ne s'étant pas manifestés sur ce milieu favorable aux algues, n'en étaient pas moins présents, et, chaque transfert de colonies de *Tetraselmis* dans une eau de mer stérile entraînait une petite quantité de bactéries qui recontaminait rapidement la nouvelle souche alguale.

En partant du même principe, nous avons tenté de réaliser un milieu mixte permettant le développement simultané des colonies alguales et bactériennes. Nous avons repris le milieu de WALNE (1966) auquel nous avons ajouté de la peptone, de l'extrait de levure et de la gélose dans les mêmes proportions que dans le milieu d'OPPENHEIMER & ZOBELL (1952). Des méthodes semblables ont déjà été utilisées (CHU, 1946 - LEWIN, 1959).

Après un étalement de 0,1 ml par boîte de Pétri d'une culture de *Tetraselmis suecica* et une incubation de 10 jours dans la salle d'algues du C.O.B., nous avons obtenu des colonies bactériennes et alguales plus ou moins espacées suivant les dilutions. Après repiquage minutieux des colonies alguales s'y prêtant, dans des tubes d'eau de mer nutritive stérile et une incubation de 15 jours, les contrôles bactériens n'ont révélé la présence d'aucun germe.

Les souches alguales axéniques de *Tetraselmis suecica* ainsi formées présentent de multiples intérêts :

- possibilité d'obtention de plus grand volume d'algues "bacteria-free" pour des expériences précises ;
- meilleure conservation de la souche mère ;
- possibilité de mettre en évidence la toxicité de souches bactériennes envers les *Tetraselmis suecica*...

4. ETUDE QUALITATIVE.

L'étude qualitative dans le cadre de nos expériences peut être abordée de deux manières différentes :

= Il est possible, au cours des numérations bactériennes, d'isoler un certain nombre de souches que l'on congèle (CHAMROUX & PRIEUR, en préparation) et sur lesquelles on effectue ultérieurement différents tests d'identification. Cette méthode présente l'avantage de différer dans le temps les études quantitative et qualitative. Seulement la description d'une souche bactérienne requière l'exécution d'une centaine de tests qui ne présentent un véritable intérêt que s'ils permettent d'appliquer les méthodes modernes de la taxonomie numérique. Or pour cela, il faut étudier simultanément un grand nombre de germes : travail impossible à réaliser dans le cadre de cette étude.

= La deuxième méthode consiste à rechercher les différents groupements fonctionnels qui réunissent les bactéries susceptibles de réaliser une même fonction. Cette technique a été souvent employée : BIANCHI (1968 et 1971), HUSSENOT (1972) ; elle est plus facile à mettre en oeuvre que la précédente, mais elle n'est intéressante que si l'on étudie l'évolution de ces groupements durant la période de l'expérience. Ce travail demande donc à être effectué parallèlement à l'étude quantitative, ce qui, pour des questions de temps, était irréalisable dans le cadre de nos expériences. Pourtant cette méthode semble être la plus enrichissante pour la compréhension des modifications physico-chimiques du milieu, bien qu'elle ne garantisse pas que les bactéries ainsi isolées soient véritablement fonctionnelles dans l'écosystème.

Toutefois trois souches semblant prédominantes ou ayant un caractère particulier ont fait l'objet d'une détermination par la méthode classique :

Souche AS01 : isolée à partir des bacs d'*Artemia salina* ; il s'agit du "germe migrant" qui envahit les cultures sur milieu gélosé.

Souche B262 : de couleur jaune, responsable des blooms bactériens enregistrés dans tous les bacs d'*Artemia* entre le 17^e et le 19^e jour de la deuxième série d'expériences.

Souche A262 : isolée à partir de la culture de *Tetraselmis suecica* utilisée lors de la deuxième série d'expériences. Responsable de la forte concentration bactérienne durant le mauvais rendement de la culture d'algues

Tableau 8 : Résultats de l'étude qualitative

CARACTERES	SOUCHE AS 01	SOUCHE B 262	SOUCHE A 262
<u>Morphologiques :</u>			
Colonie de couleur	Blanche	Jaune	Marron
Forme des bactéries :			
bâtonnets	+	-	+
cocci	-	+	-
spirille	-	-	-
Spores à 80°C	-	-	-
Mobilité	+	-	+
Gram	-	+	-
<u>Ecologiques :</u>			
Salinité 0 ‰	-	+	+
20 ‰	+	+	+
70 ‰	+	+	+
100 ‰	+	+	-
Température 5 °C	-		
20 ‰	+		
30 ‰	+	+	+
37 ‰	+	+	-
41 ‰	+	-	-
<u>Biochimiques :</u>			
Oxydatif	-	-	-
Fermentatif	+	+	+
Alcalin	-	-	-
Oxydase	+	-	+
Catalase	+	+	+
Acidifie glucose	+	+	+
mannitol	+	+	+
sorbitol	-	-	+
inositol	-	-	-
H ² S	-	-	-
Uréase	-	-	-
Indole	+	-	-
Acétoïne	+	+	+
Gélatinase	+	-	-
Tween 80		-	+
Rouge de Méthyle	+	+	-
Dénitrication	+	-	-
B Galactosidase	-	-	-
Arginine	+	-	?
Lysine	+	-	?
Ornithine	+	-	?
Citrate	+	-	+

4.1. Protocole d'étude.

PRIEUR a inséré les souches A 262 et B 262 dans une série de germes en cours d'étude par la méthode de taxonomie numérique, mais malheureusement, à l'heure actuelle, les résultats ne sont pas encore connus. Toutefois, sur ses conseils, nous avons réalisé un certain nombre de tests portant sur des caractéristiques morphologiques, écologiques, biochimiques et nutritionnelles qui suffisent à la détermination jusqu'au genre des germes isolés. Le protocole d'étude suivi est celui de PRIEUR (1974) et les résultats sont consignés dans le tableau n° 8.

4.2. Identification des souches :

Parmi les nombreuses clés de détermination des bactéries, nous avons utilisé celle établie par BALEUX (1976) à partir du "BERGEY's manual of determinative bacteriology" (8e édition, 1974). Nous avons obtenu les déterminations suivantes :

AS_01 : la souche "migrante" est un *Aeromonas* (famille des *Vibrionaceae*) par ses caractères : bacille gram - ; fermentatif oxydase + ; gélatinase + ; acétoïne + ; mobile ; indole + et bâtonnet droit. Cette détermination par la clé de BALEUX semble confirmée par toutes les caractéristiques morphologiques et biochimiques mentionnées dans BERGEY (1974) à propos des *Aeromonas*. Ainsi, comme la souche AS 01, les *Aeromonas* acidifient le glucose, ne fermentent pas l'inositol, sont arginine + et réduisent les nitrates en nitrites.

B_262 : isolée des bacs d'*Artemia* est un *Staphylococcus* (famille des *Micrococcaceae*) par ses caractères : cocci gram + ; catalase + ; immobile ; fermentatif. Cette détermination est également confirmée par les caractéristiques des Staphylocoques mentionnées par BERGEY (1974).

A_262 : isolée des cultures de *Tetraselmis* serait un *Photobacterium* (famille des *Vibrionaceae*) par ses caractères : bacille gram - ; fermentatif ;

oxydase + ; indole - et mobilité + ; mais certaines caractéristiques des *Photobacterium* consignées dans le "BERGEY's manual" ne correspondent pas aux résultats trouvés. Les *Photobacterium* sont théoriquement rouge de Méthyle + et réduisent les nitrates en nitrites. Toutefois il se peut que le développement peu rapide de la souche A 262 soit à l'origine d'erreurs par une lecture trop rapide des résultats des réactions. Nous notons ici, la faiblesse de la taxonomie classique qui repose sur des critères morphologiques et physiologiques et dont l'interprétation erronée d'un de ceux-ci peut conduire à une fausse détermination. La taxonomie numérique est au contraire fondée sur le principe du rapprochement des bactéries qui possèdent le plus grand nombre possible de caractères communs.

Cette souche a fait l'objet d'un test supplémentaire afin de rechercher une éventuelle toxicité envers les *Tetraselmis suecica* puisqu'elle avait été isolée pendant la période de mauvais rendement de cette culture d'algues. L'obtention de souches de *Tetraselmis suecica* "bacteria-free" (§ 3.5) a permis la réalisation de ce test : sur toute la surface d'une boîte de Pétri contenant un milieu "mixte" décrit au paragraphe 3.5. estensemencée une suspension d'algues axéniques ; au centre de la boîte nous avons déposé une faible quantité de la souche A 262 et après incubation, nous n'avons pas observé d'auréole d'inhibition autour des bactéries ; la souche A 262 ne semble donc pas avoir d'action toxique envers les *Tetraselmis suecica* (photo n° 3).



Photo 3 : Test de toxicité de la souche A 262 envers une culture
d'algue *Tetraselmis suecica* "bacteria free"

(en sombre : colonies alguales)

(en blanc : colonies bactériennes)

Photo 3 : Test de toxicité de la souche A 262 envers une culture
d'algue *Tetraselmis suecica* "bacteria free"

5. CONCLUSION.

Cette étude, bien qu'incomplète, aura permis de mettre l'accent sur l'importance de l'activité bactérienne dans un écosystème. Le rôle de ces micro-organismes dans la minéralisation des déchets organiques est primordial ; ils permettent la remise en circulation du carbone et de l'azote immobilisés dans les macromolécules organiques. Mais en plus de cette fonction fondamentale, les bactéries jouent un rôle dans la nutrition de nombreux organismes.

L'étude quantitative dans les élevages d'*Artemia* aura mis en évidence la nécessité du contrôle bactérien tant au niveau même de l'élevage que dans les différentes sources de contamination possible. Parallèlement nous avons noté les soins particuliers que l'on doit apporter à la source de nourriture principale, surtout quand celle-ci est naturelle. Les cultures d'algues ont été en effet presque toujours à l'origine des importantes variations des paramètres mesurés : soit directement, en apportant des éléments azotés sous forme de nitrates et nitrites et une forte biomasse bactérienne ; soit indirectement, en orientant le métabolisme digestif des *Artemia* vers une digestion protéasique qui entraîne une excrétion ammoniacale accrue.

Ce type d'étude bactériologique, effectuée selon une méthodologie déjà employée pour les Bivalves marins par LUCAS & PRIEUR (1974) peut être adapté à tout élevage d'invertébrés marins, même en milieu renouvelé. En effet, il ne faut pas oublier que même à l'échelle industrielle, un élevage est un milieu confiné où les conditions bactériologiques et physico-chimiques sont totalement différentes de la mer libre. Comme l'a montré WALNE (1958), l'indice de réussite des élevages varie en fonction inverse de leur degré de pollution microbiologique. La maîtrise totale d'un élevage passe donc non seulement par la surveillance des paramètres physico-chimiques du milieu, mais également par une connaissance parfaite de la microflore et des facteurs susceptibles de modifier les équilibres des différentes populations bactériennes.

BIBLIOGRAPHIE

- ALBRIGHT L.J. et WILSON E., 1974 - Sub-lethal effects of several metallic salts-organic compounds combinations upon the heterotrophic microflora of a natural water. *Water Research*, Vol. 8, pp. 101-105.
- BALEUX B., 1976 - La dégradation biologique des agents de surface. Etude chimique et microbiologique. Thèse soutenue à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- BEDNARZ T., 1972 - Attempts at elimination of bacteria from algal cultures by means of antibiotics. *Acta microbiologica Polonica*, ser. B, Vol. 4 (21), n° 3, p. 165-189.
- BERGEY (1974) - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8e édition.
- BERLAND B.R., BONIN D.J., LABORDE P.L. et MAESTRINI S.Y., 1972 - Variations de quelques facteurs estimatifs de la biomasse, et en particulier de l'ATP, chez plusieurs algues marines planctoniques. *Marine Biology*, Vol. 13, n°4, pp. 338-345.
- BIANCHI A.J.M., 1968 - Aperçu sur la distribution de certains groupements fonctionnels bactériens au niveau de trois stades d'évolution des feuilles de Posidonies. *Rec. Trav. St. Mar. End., Bull. 43, Fasc. 59.*
- BIANCHI A.J.M., 1971 - Distribution de certaines bactéries hétérotrophes aérobies dans les sédiments profonds de Méditerranée Orientale. *Marine Biology*, Vol. 11, n°2, pp. 106-117.
- BIANCHI A., BIANCHI M., 1971 - La numération des populations bactériennes du milieu marin. *Tethys*, 3(4), 1971(1972), pp. 697-704.
- BOUCHER J., SAMAIN J.F., 1975 - Etude de la nutrition du zooplancton en zone d'upwelling par la mesure des activités enzymatiques digestives. *Proc. 9th Europ. mar. biol. Symp.*, pp. 329-341.
- BOUCHER J., LAUREC A., SAMAIN J.E., SMITH S.L., 1975 - Etude de la nutrition, du régime et du rythme alimentaire du zooplancton dans les conditions naturelles, par la mesure des activités enzymatiques digestives. *Proc. 10th Eur. mar. biol. Symp.*
- BREMOND R., VUICHARD R., 1973 - Les paramètres de la qualité des eaux. Ministère de la protection de la Nature et de l'Environnement.

- BRISOU J., 1963 - Numération directe des bactéries sur membranes filtrantes. *Feuillets Biol.*, 17(4), p. 5-6.
- BRISOU J., DÉRAUTLIN DE LAROY Y., URCIER R., CAMPELLO F., 1963 - Numération comparative des bactéries marines par cultures et lecture directe sur membranes. *C.R. Soc. Biol.*, 157(3), p. 635-638.
- BRISOU J., 1970 - La vie des microbes dans les mers et pollution. Situation actuelle Perspectives. *Rev. Intern. Oceanogr. Méd.*, 17, p. 127-145.
- CALABRESE A., DAVIS H.C., 1970 - Tolerances and requirements of embryos and larvae of bivalve molluscs. *Helgol. Wiss. Meeresunters*, 20, p. 553-564.
- CARVAL J.P., PRIEUR D., en préparation - Analyses physico-chimiques et bactériologiques dans une éclosérie de Bivalves marins : techniques d'études et premiers résultats.
- CHU S., 1946 - Note of the technique of making bacteria-free cultures of marine diatoms. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 31, p. 97-106.
- FLOODGATE G.D., 1964 - The enumeration of bacteria in coastal waters. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 44(2), p. 365-372.
- HUSSENOT J., 1972 - Contribution à l'écologie des eaux stagnantes : étude de l'étang de Barbillon (Sologne). Mesure de la production bactérienne des eaux. Thèse de 3e cycle présentée à l'Université d'Orléans.
- KUZNETSOV S.I., ROMANENKO W.I., 1966 - Produktion der biomasse heterotropher bakterien und die Geschwindigkeit ihrer Vermehrung in Rybinsk-Stausee. *Verh. Int. Verein. Limnol.*, 16(3), p. 1493-1500.
- LEWIN R.A., 1959 - The isolation of algae. *Revue algologique*, n°3, p. 181-197.
- LOWRY O.M., and al., 1951 - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, p. 265-275.
- LUCAS A., PRIEUR D., 1974 - Le contrôle bactérien des élevages de larves de bivalves "Colloque sur l'Aquaculture", *Actes et Colloques*, n° 1, 1974, CNEXO éd.
- MAYZAUD P., DALLOT S., 1973 - Respiration et excrétion azotée du zooplancton. I. Evaluation des niveaux métaboliques de quelques espèces de Méditerranée Occidentale. *Marine Biology*, 19, p. 307-314.
- MORI S., YAMAMOTO G., 1975 - Productivity of communities in Japanese inland waters. Published by University of Tokyo Press.
- OPPENHEIMER C.M., ZOBELL C.E., 1952 - The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. mar. Res.*, 11, p. 10-18.
- PARSONS T.R., STEPHENS K., STRICKLAND J.D.H., 1961 - On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankton. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 18(6).

- PRIEUR D., 1974 - Les bactéries associées aux élevages de larves de Bivalves.
Thèse de 3e cycle présentée à l'Université de Bretagne Occidentale.
- PRIEUR D., LE ROUX S., 1975 - Comparative growth of some algal populations and their associated bacteria in laboratory cultures.
10e Symposium Européen de Biologie marine. Ostende, Sept. 1975 (sous presse).
- SALIBA L.J., AHSANULLAH M., 1973 - Acclimation and tolerance of *Artemia salina* and *Ophryotrocha labronica* to copper sulfate. *Marine Biology*, 23, 297-302.
- SAMAIN J.F., BOUCHER J., 1974 - Dosage automatique et simultané de l'amylase et des protéines du zooplancton. *Ann. Inst. Ocean., Paris*, T.50(2), p. 199-205.
- SAMAIN J.F., BOUCHER J., BUESTEL D., 1975 - Signification biologique des teneurs protéiques et des activités de l'amylase et des protéases chez *Artemia salina* L. Aspects d'application à l'étude de la nutrition. *Proc. 10th Eur. Mar. Biol. Symp.*
- STANIER R.Y., DOUDOROFF M., ADELBERG E.A., 1966 - Précis de microbiologie.
Masson et Cie Editeurs.
- TAUB F.B., DOLLAR A.M., 1968 - The nutritional inadequacy of *Chlorella* and *Chlamydomonas* as food for *Daphnia pulex*.
Limnol. Oceanogr., 13, p. 607-617.
- TEZUKA Y., 1971 - Feeding of *Daphnia* on planktonic bacteria. *Jap. J. Ecol.*, 21, p. 127-134.
- TEZUKA Y., 1974 - An experimental study on the food chain among bacteria, *Paramecium* and *Daphnia*. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.*, 59, 1, p. 31-37.
- WALNE P.R., 1966 - Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* (L.). *Fish. investigations, série 2*, 25, p. 1-53.
- WURTZ A., 1947 - Rôle et importance des bactéries dans l'eau. *Bull.Fr.Piscic.*
- ZHUKOVA A.I., 1963 - On the quantitative significance of microorganismes in nutrition of aquatic invertebrates. Symposium on Microbiology compiled and edited by Carl H. OPPENHEIMER.
- ZOBELL C.E., 1963 - Domain of the marine Microbiologist. Symposium on marine microbiology compiled and edited by Carl H. OPPENHEIMER.