

33

ÉVOLUTION DE LA COMMUNAUTÉ BACTÉRIENNE HÉTÉROTROPHE DE L'EAU DE MER LORS D'UNE EXPÉRIENCE D'AQUACULTURE DE CREVETTES PENEIDES EN SYSTÈMES CLOS

L. SOHIER et M. BIANCHI

Laboratoire de Microbiologie Marine, 3, place Victor-Hugo,
Université de Provence, 13331 MARSEILLE Cedex 3 (FRANCE)

RÉSUMÉ - Au cours d'une expérience d'élevage de crevettes *Penaeus japonicus* en systèmes clos, 417 souches bactériennes appartenant à la microflore hétérotrophe viable sur milieu gélosé ont été isolées des boîtes de comptages. Parmi ce lot, 40 souches ont été isolées d'une moule utilisée pour la nourriture des animaux et 40 souches ont été isolées du tractus digestif d'une des crevettes au bout de 6 mois d'élevage. Toutes les autres souches sont issues de prélèvements d'eau effectués à différents moments de l'expérience. L'étude quantitative et l'étude qualitative menée selon les méthodes de taxonomie numérique, montrent une évolution identique de la communauté bactérienne hétérotrophe dans les différents bacs malgré des charges initiales en animaux différentes. L'analyse du dendrogramme obtenu permet de préciser les caractéristiques et la nature des populations en présence à différents moments de l'expérience en tenant compte de l'apport continu et croissant de bactéries et de matière organique dû à l'élevage des animaux.

Mots clés : microflore hétérotrophe, milieu marin, taxonomie numérique, système clos, aquaculture, peneides.

ABSTRACT - The quantitative and qualitative evolution of the heterotrophic bacterial community of sea water was studied throughout an experimental rearing of *Penaeus japonicus* in closed systems. Cluster analysis was realised on 417 strains coming from water sampled at different moments of the experiment. This strains collection include 40 strains coming from a mussel used for diet and 40 strains coming from the digestive tract of one prawn after six month rearing. Quantitative and qualitative studies have both shown a similar evolution of heterotrophic microflora whatever the initial animal load was. The dendrogram obtained led to describe characteristics of the various populations constituting the heterotrophic bacterial community of the water environment considering the increasing number of bacteria brought in the system by breeding activities.

Key words : heterotrophic microflora, sea water, numerical taxonomy, closed system, aquaculture, peneides.

INTRODUCTION

Le système clos marin a toujours été un instrument privilégié en bactériologie marine pour l'étude de la dynamique des populations bactériennes. Ce type de système expérimental permet de tester les capacités de réaction d'une communauté bactérienne face à des variations artificielles des paramètres physico-chimiques du milieu. Les résultats obtenus permettent de mieux cerner le rôle des différentes microflores au sein des écosystèmes naturels, de plus ils offrent l'avantage d'être en théorie directement applicables aux écosystèmes artificiels ou naturels clos tels que ceux utilisés pour l'aquaculture marine. Les conditions physico-chimiques rencontrées dans les systèmes d'élevage d'animaux marins favorisent le développement de trois communautés bactériennes pélagiques :

- une communauté autotrophe photosynthétique ;
- une communauté hétérotrophe aérobie ou anaérobie facultative ;
- une communauté chémolithotrophe aérobie.

Parmi ces trois communautés, les bactéries hétérotrophes représentent le seul chaînon trophique responsable de la minéralisation de la matière organique qui est toujours excédentaire dans l'eau d'aquaculture en système clos. Si dans ces eaux subissant des enrichissements importants et continus en protéines et en azote inorganique, l'activité des bactéries de la communauté chémolithotrophe a souvent été étudiée et plus particulièrement l'activité des bactéries nitrifiantes, peu de travaux ont été consacrés à la communauté hétérotrophe et à ses capacités de dégradation de la matière organique.

Afin d'aborder ces problèmes, une expérience d'élevage en système clos a été menée durant 8 mois sur des juvéniles de crevettes de l'espèce *Penaeus japonicus*. Au cours de cette expérience, une étude quantitative et qualitative de la microflore hétérotrophe viable sur milieu gélosé 2216E (Oppenheimer, Zobell, 1952) a été réalisée en parallèle avec un suivi des paramètres physico-chimiques du milieu aquatique. L'emploi de méthodes d'écologie numérique a permis de préciser la nature des bactéries hétérotrophes amenées par l'eau de remplissage, la nourriture et le tractus digestif des animaux ainsi que celles contenues dans le milieu d'élevage à différents moments de l'expérience. L'évolution de la communauté bactérienne hétérotrophe est abordée par la comparaison des potentialités cataboliques et des capacités nutritionnelles caractérisant les populations mises en évidence.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Un élevage de crevettes est réalisé dans cinq bacs PVC contenant chacun 240 litres d'eau de mer fraîchement prélevée dans le golfe de Marseille. Chaque bac est équipé d'un double fond sableux et d'un système de recirculation centrale par airlift. Trois charges initiales en crevettes sont testées : 90, 120 et 150 g/m². Les deux bacs supportant les charges extrêmes sont doublés.

Le comptage de bactéries hétérotrophes est réalisé par double étalement de 0,2 ml de 3 dilutions successives de l'échantillon à analyser sur milieu gélosé 2216E (Oppenheimer, Zobell, 1952). L'incubation des boîtes est de 15 jours à température de l'eau de prélèvement. L'analyse qualitative de la microflore bactérienne hétérotrophe est réalisée à partir de souches prélevées au hasard parmi celles ayant donné des colonies visibles sur les boîtes de comptage. Les origines ainsi que les nombres de souches prélevées dans l'eau d'élevage à différents moments de l'expérience sont consignés dans le tableau I. Mis à part les souches issues de l'eau d'élevage, 40 souches ont été isolées de l'eau de remplissage (T0), 40 souches d'un échantillon issu de la cavité palléale d'une moule utilisée pour la nourriture des animaux (MU) et 40 souches d'un prélèvement effectué sur le tractus digestif d'une crevette de 20 g après 6 mois d'élevage (PR).

Après purification des souches par repiquages successifs, celles-ci ont fait l'objet d'une description selon 101 caractères parmi lesquels figurent 34 caractères morphologiques (observation des colonies et des cellules), 24 caractères physiologiques (coloration de Gram, métabolisme respiratoire, production de 9 exoenzymes et tolérances vis-à-vis de la salinité et de la température) et 43 caractères nutritionnels (utilisation de différents substrats comme seule source de carbone et d'énergie et étude de la prototrophie). Cette technique d'étude a déjà été décrite dans une publication (Van Wambeke *et al.*, 1984).

L'analyse des données est effectuée après codification des résultats de tests en langage binaire par l'utilisation d'un programme de classification hiérarchique ascendante. Selon le principe d'Adanson, un poids équivalent est attribué à chaque caractère. La méthode choisie pour comparer les souches est le calcul de la distance du KH12. La méthode choisie pour l'agrégation des souches et l'obtention d'un dendrogramme, est celle de l'agrégation selon la variance. Les résultats de l'analyse ainsi effectuée font apparaître une

variance interclasse maximale et une variance intraclasse minimale (Delabre *et col.*, 1973).

Temps de prélèvement	Nombre total de souches isolées	Nombres de souches issues des différents échantillons					
		EAU Bacs 1 et 2	EAU Bac 3	EAU Bacs 4 et 5	EAU Remplissage	MOULE	Tractus digestif CREVETTE
Temps 0	40	-	-	-	40	-	-
4 ^e jour	60	40	-	20	-	-	-
5 ^e jour	40	-	20	20	-	-	-
6 ^e jour	20	-	-	20	-	-	-
7 ^e jour	80	40	20	20	-	-	-
15 ^e jour	40	-	-	-	-	40	-
19 ^e jour	57	27	-	30	-	-	-
6 ^e mois	40	-	-	-	-	-	40
7 ^e mois	40	20	20	-	-	-	-
TOTAL	417	127	60	110	40	40	40

Tableau 1 : Origine et nombres de souches isolées et étudiées pour l'analyse numérique. Les bacs 1 et 2 contenaient une charge initiale de 90 g de crevettes/m²; le bac 3 une charge de 120 g/m²; les bacs 4 et 5 une charge de 150 g/m².

L'exploitation du dendrogramme nécessite la définition d'un niveau de coupure matérialisant la distance taxonomique en dessous de laquelle les classes d'individus formées ou taxons, sont assimilables à des écotypes du niveau générique ou spécifique dans le meilleur des cas. La méthode employée pour définir ce niveau de coupure est directement dérivée de la méthode proposée par Bianchi (1971) qui considère la courbe d'entrée des souches dans le dendrogramme en fonction de la distance taxonomique. Pour les collections de souches comportant plusieurs centaines d'individus, cette méthode est difficilement utilisable du fait des faibles valeurs de distances taxonomiques calculées par le χ^2 . Par contre, la définition du niveau de coupure comme étant celui à partir duquel le nombre de nœuds formés devient supérieur au nombre d'individus intégrés fournit les mêmes résultats sans qu'il soit nécessaire de construire la courbe (Sohier, 1983).

La partition de la collection en taxons est une première étape de l'exploitation du dendrogramme, chaque taxon est ensuite caractérisé par des indices synthétiques matérialisant les caractéristiques de la souche type (Bianchi, 1971).

- EAI : indice moyen de production d'exoenzymes.
- UAI : indice de versatilité nutritionnelle.
- UA-AA : indice moyen, d'utilisation des acides aminés. - UA-S, UA-OL, UA-AO, UA-AG : idem respectivement pour les sucres, les alcools, les acides organiques et les acides gras.

D'autres indices enfin sont simplement définis comme un pourcentage de souches possédant le caractère considéré parmi les souches composant le taxon.

RÉSULTATS

Étude quantitative

Les comptages indirects sont effectués pour trois bacs de charge animale initiale différente. Ils laissent apparaître une évolution similaire du nombre de bactéries hétérotrophes

quelle que soit cette charge. De même, une évolution similaire des paramètres physico-chimiques dans tous les bacs avaient été mis en évidence précédemment (Sohier et Bianchi, 1983). Les variations quantitatives les plus significatives se situent dans la période allant de T0 à T25 jours (fig. 1). L'évolution à long terme fait apparaître une diminution progressive des valeurs de comptage après le 25^e jour. Pour le bac de plus forte charge initiale (150 g/m²) les valeurs passent de $1.2 \cdot 10^5$ bactéries/ml à $1.5 \cdot 10^3$ bactéries/ml au 8^e mois, dans le bac moyenne charge (120 g/m²) elles passent de $3 \cdot 10^5$ à $2 \cdot 10^3$ bactéries/ml et enfin de 10^6 à $2 \cdot 10^3$ dans le bac faiblement chargé (90 g/m²).

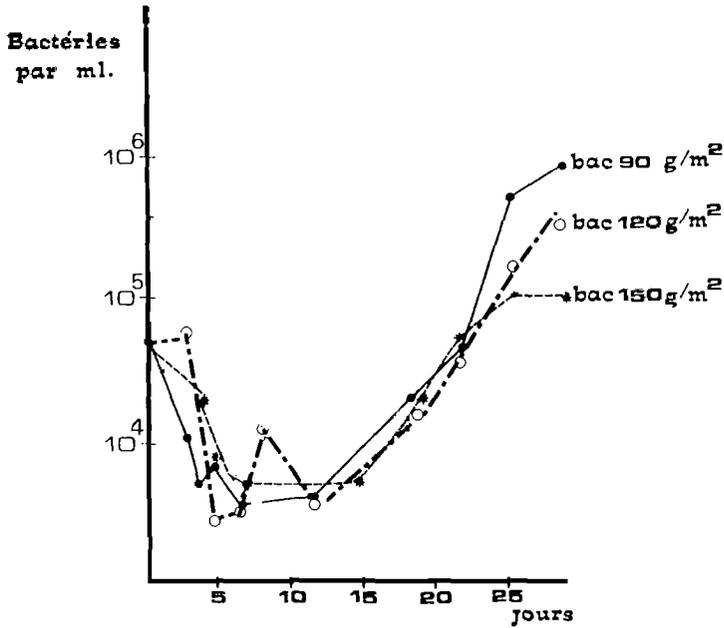


Figure 1. Évolution de la microflore hétérotrophe viable sur milieu de Zobell au cours des 25 premiers jours d'expérience sur 3 bacs de charge animale différente.

Étude qualitative

Les 417 souches prélevées dans l'eau d'élevage, la moule ou le tractus digestif de la crevette ont été traitées en une seule collection pour la réalisation d'un dendrogramme général (fig. 2). L'aspect du dendrogramme et la répartition des souches en abscisse selon leur origine nous a amenés à distinguer 5 grands groupes de souches séparés à 0.045 de distance taxonomique présentant des caractéristiques globales discriminantes (tableau 2). Ces groupes seront appelés par la suite populations A, B, C, D et E. Le groupe C n'est pas analysé dans cette étude, très hétérogène, il regroupe en fait les souches hétéroclites de cette collection qui est composée à 95 % par des bacilles Gram- (tableau 2).

La détermination du niveau de coupure donne la distance taxonomique de 0,005 comme la plus propice à l'obtention de phénons homogènes permettant de définir 63 écotypes différents représentés chacun par au moins 2 souches de la collection.

- Population A. Le groupe A est constitué de 114 souches agrégées en 11 phénons d'au moins 2 souches (tableau 2). L'origine des souches montre que l'on trouve dans ce groupe

exclusivement des souches issues de la moule, du tractus digestif de la crevette et de l'eau d'élevage prélevée au 4^e jour et au 7^e mois d'expérience. Les valeurs élevées des indices synthétiques révèlent des potentialités enzymatiques élevées associées à des capacités et à une versatilité nutritionnelles également élevées. Les souches de la population A sont toutes des bacilles Gram- fermentatifs assimilables en majorité à des bactéries du groupe des vibrioïdes ou à des entérobactéries.

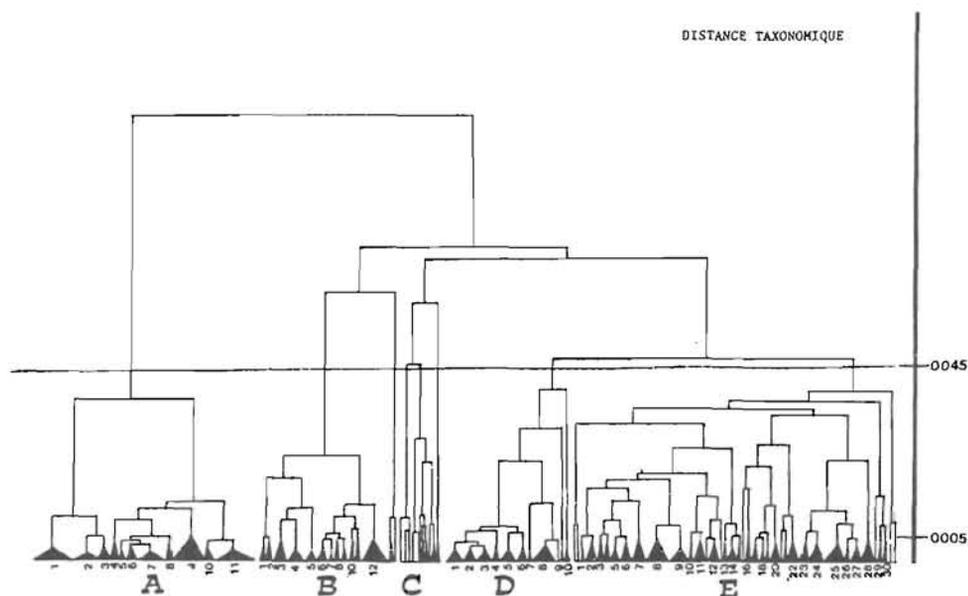


Figure 2. Dendrogramme général réalisé à partir de l'étude taxonomique des 417 souches de la collection. Les phénons apparaissent sous l'aspect de triangles noirs.

- Population B. Le groupe B est constitué de 64 souches formant 12 phénons de plus de 2 souches (tableau 2). Parmi les souches de ce groupe, 52 sont issues des prélèvements d'eau effectués du 5^e au 7^e jour d'élevage. Les valeurs des indices synthétiques laissent apparaître des potentialités cataboliques faibles mais souvent rencontrées parmi les bactéries marines et des capacités nutritionnelles très faibles en absence de facteurs de croissance. Les bactéries de cette population utilisent très peu des substrats proposés comme seule source de carbone et d'énergie. Les souches rencontrées dans ce groupe sont toutes des bacilles Gram- non fermentatifs assimilables aux genres *Moraxella* et *Acinetobacter* ou au groupe des pseudomonades.

- Population D. Le groupe D est constitué de 63 souches formant 10 phénons d'au moins 2 souches, une seule souche restant isolée. Parmi les 63 souches, 39 sont issues des prélèvements d'eau au 19^e jour. Tous les phénons excepté le phénon D5 sont constitués d'une majorité si ce n'est entièrement par des souches prélevées au 19^e jour (tableau 2). Les potentialités cataboliques de ces souches restent proches de celles de la population B. Par contre, les capacités nutritionnelles et la versatilité de ces souches caractéristiques du 19^e jour augmentent sensiblement par rapport à la population B. Seule l'utilisation des acides aminés apparaît encore faible pour des souches marines assimilables aux groupes morpho-physiologiques des pseudomonades et des genres *Moraxella* et *Acinetobacter*.

- Population E. Le groupe E avec 157 souches est le plus important en taille et le plus

Nombre de souches	EA	UAI	UAA	US	UOL	UOA	UAG
40	22	34	29	44	47	22	60

Tableau 3 : Caractéristiques globales des souches prélevées dans l'eau de mer naturelle ayant servie au remplissage des bacs.

DISCUSSION

L'évolution quantitative de la microflore hétérotrophe viable sur milieu gélosé est apparue indépendante de la charge animale initiale dans la gamme de valeurs testées au cours de cette expérience. Les premiers résultats de l'expérience portant sur l'évolution physico-chimique des milieux testés, avaient déjà montré une évolution similaire des concentrations en azote inorganique quelle que soit la charge animale initiale du bac (Sohier, Bianchi, 1983). Des expériences réalisées avec une charge initiale 10 fois plus élevée que la moyenne des charges testées lors de la présente expérience ont fait apparaître une diminution identique du nombre de bactéries hétérotrophes dans les premiers jours d'élevage (Sohier, 1983).

La diminution du nombre de bactéries hétérotrophes au cours de la phase d'accumulation d'azote inorganique ammoniacal ou nitreux est un phénomène qui a été plusieurs fois observé en système clos (Kawai *et al.* 1964; Lesel, 1979; Mevel, Chamroux, 1981). Si aucune considération qualitative n'était prise en compte, les diminutions des valeurs de comptage pourraient s'expliquer par l'effet des concentrations en azote ammoniacal et nitreux qui restent cependant au-dessous des valeurs inhibitrices connues (Ingram, 1976). L'aspect qualitatif du problème est d'ailleurs confirmé par les comptages de microflore totale par épifluorescence (Sohier, Bianchi, 1983) qui font apparaître des variations inverses à celles des comptages sur milieu gélosé au cours des 25 premiers jours d'expérience.

Ces résultats sont contraires à ceux communément observés dans les systèmes clos marins expérimentaux dépourvus de double fond et subissant des enrichissements artificiels en azote minéral ou organique (Bianchi, Van-Wambeke, 1982). Dans de tels systèmes, on assiste généralement à un développement rapide des microflores hétérotrophes durant les 8 à 10 premiers jours d'expérience. Le rôle joué par le filtre biologique et les conditions particulières créées par l'élevage d'animaux marins en systèmes clos montrent que les résultats obtenus sur pilote à enrichissement artificiel sont difficilement applicables aux élevages.

L'étude qualitative réalisée sur la microflore hétérotrophe viable sur milieu gélosé a pour but de préciser les caractéristiques des populations bactériennes disparaissant, subsistant ou se développant lors des variations quantitatives.

Les souches de la population A caractérisées par des indices synthétiques élevés sont liées au flux de nourriture et à l'activité animale dans le système clos. Les souches de cette population issues de l'eau d'élevage ont été prélevées au 4^e jour et au 7^e mois de l'expérience. Dans le premier cas (4^e jour), ces souches sont isolées uniquement à partir des deux bacs ayant reçu l'eau de transport des animaux provenant du Centre Océanologique de Bretagne et dans le deuxième cas (7^e mois) on peut penser que ces souches sont liées à l'augmentation de la charge animale qui atteint alors 1000 à 2000 g/m² selon les bacs.

Alors qu'au 4^e jour, cette population ne représente que 40 à 50 % de la communauté totale, au 7^e mois d'expérience elle représente 60 à 70 % de la microflore hétérotrophe viable sur milieu gélosé. La richesse de l'eau d'élevage en matière organique à la fin de l'expérience

pourrait expliquer la plus forte proportion de souches de ce type se développant sur le milieu de Zobell lui-même relativement riche en matière organique.

La population B présente l'originalité de ne regrouper que des souches prélevées entre le 5^e et le 7^e jour. Cela signifierait que la communauté présente au moment où les valeurs de comptages sont les plus faibles est alors réduite à cette population caractérisée par de très faibles capacités nutritionnelles, d'où leur difficulté à se développer sur le milieu de comptage utilisé. La présence de quelques souches issues de l'eau de remplissage dans cette partie du dendrogramme, confirme la présence de souche du même type dans l'eau de remplissage. L'élément le plus intéressant de cette observation reste la disparition complète durant cette phase des germes prototrophes fermentatifs tels ceux de la population A. Au 4^e jour d'élevage, de nombreux germes vibrioïdes et chitinolytiques avaient été mis en évidence, à partir du 5^e jour ils disparaissent du milieu. Entre le 5^e jour et le 7^e jour le milieu exerce une pression sélective sur les germes présentant des indices synthétiques élevés, seuls les germes auxotrophes et peu versatiles semblent subsister dans le milieu d'élevage. Les valeurs de comptages directs qui apparaissaient plus élevées à ce moment-là mais avec des formes caractéristiques en chaînes et en filaments laissent supposer une inadéquation du milieu de culture utilisé pour les dénombrements de bactéries viables.

Si l'on pouvait qualifier la population B de résistante, la population D caractéristique des prélèvements effectués au 19^e jour apparaît comme une population de colonisation du milieu d'élevage. En effet, la communauté qui a retrouvé un niveau quantitatif supérieur à celle de l'eau de remplissage est constituée presque exclusivement de souches regroupées dans la population D. Ces souches gardent néanmoins par leurs capacités nutritionnelles faibles (tableau 2) une trace de la pression sélective exercée au cours des 10 premiers jours de fonctionnement du système clos.

La population E dont les caractéristiques globales se rapprochent des caractéristiques de la communauté issue du milieu naturel méditerranéen côtier (tableau 3) regroupe des souches d'origines variées. La part des souches issues des différents échantillons se regroupant dans cette partie du dendrogramme pourrait fournir une idée de la persistance des souches typiquement marines dans l'eau d'élevage. Dans ce sens, on remarque qu'au 7^e mois, la communauté bactérienne hétérotrophe de l'eau d'élevage se compose uniquement de 2 des populations mises en évidence au cours de cette étude. La population A représente alors 60 à 70 % des souches tandis que tous les autres germes se rattachent à la population E.

CONCLUSION

Lors de cette expérience, l'utilisation des techniques de taxonomie numérique a permis de préciser l'évolution d'une communauté bactérienne hétérotrophe dans un écosystème marin clos. L'utilisation de cet écosystème à des fins aquacoles n'a pas entraîné une simple juxtaposition des communautés apportées soit par l'eau de remplissage, soit par la nourriture, soit par les animaux. Seule la période comprise entre T0 et 4 jours reflète cette juxtaposition. A partir du 5^e jour, un véritable état de crise apparaît au sein de la communauté bactérienne hétérotrophe. Les bactéries apportées par la mise en place de l'écosystème disparaissent et sont remplacées par une population bactérienne aux caractéristiques originales capable de se développer dans les conditions créées par les autres composantes de l'écosystème. La disparition des souches de la population A est intéressante en aquaculture sans renouvellement d'eau dans le sens où elle permet une élimination de germes à potentialités pathogènes dès le début de l'expérience. Ceci ne se serait certainement pas produit si l'apport des animaux et des germes associés avait eu lieu après un "conditionnement" préalable des bacs et des filtres à sable (Spotte, 1970). Dans ce sens

il apparaît nécessaire que l'installation de la nitrification se fasse en présence des animaux et non avant leur apport.

-
- BIANCHI A., 1971. Écologie et taxonomie des bactéries hétérotrophes aérobies des sédiments marins. Leur participation à la dégradation des matières organiques. *Thèse Doctorat d'État. Université Aix-Marseille II.*
- BIANCHI M., VAN-WAMBEKE F., 1982. Dynamique des communautés bactériennes d'une eau lagunaire enrichie en azote. *Océanol. Acta. Actes Symposium international sur les lagunes côtières, SCOR/IABO/UNESCO, Bordeaux, 8-14 septembre 1981, 403-406.*
- DELABRE M., BIANCHI A. and VERON M., 1973. Étude critique de méthodes de taxonomie numérique. Application à une classification de bactéries aquicoles. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 124 A: 489-506.*
- INGRAM M., 1976. The microbiological role of nitrite in meat products. In *Microbiology in agriculture, fisheries and food, Skinner and Carr (eds), p. 1-17.*
- KAWAI A., YOSHIDA Y., and KIMATA M., 1964. Biochemical studies on the bacteria in aquarium with circulating system-I. Changes of the qualities of breeding water and bacterial population of the aquarium during fish cultivation. *Bull. Japan. Soc. Fish. Sci., 30: 55-62.*
- LESEL R., 1979. Étude de la nitrification dans les circuits d'eau recyclée. II: Dynamique des microflores bactériennes. *Bull. Cent. Etud. Rech. Sci., Biarritz, 12, (4): 651-680.*
- MEVEL G., CHAMROUX S., 1981. A study of nitrification in the presence of prawns (*Penaeus japonicus*) in marine closed systems. *Aquaculture, 23: 29-43.*
- OPPENHEIMER C. H. and ZOBELL C. E., 1952. The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. Mar. Res. 11: 10-18.*
- SOHIER L., BIANCHI M., 1983. Régulation par des bactéries nitrifiantes des taux d'ammoniaque et de nitrite dans des bassins d'aquaculture marine. *Océanis, 9, (3): 265-273.*
- SOHIER L., 1983. Participation des communautés bactériennes autotrophes et hétérotrophes à l'évolution de la nitrification dans les systèmes clos marins. Application à l'aquaculture de crevettes *Penaeus japonicus* sans renouvellement d'eau. *Thèse 3^e cycle Microbiologie. Faculté de Pharmacie. Marseille.*
- SPOTTE S. H., 1970. Fish and invertebrate culture. *Wiley-Interscience, New York.*
- VAN WAMBEKE F., BIANCHI M. and CAHET C., 1984. Short-term reactivity of nitrogen enriched seawater of an eutrophic lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science. 19: 291-301.*