

UNIVERSITÉ MONTPELLIER II
— SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC —

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER II

Discipline : Biochimie et Biologie Moléculaire
Formation Doctorale : Sciences des Aliments
Ecole Doctorale : Science et Procédé Biologiques et Industriels

présentée et soutenue publiquement
par

Noémie LEONARD
Ingénieur ENSAM

le 29 Novembre 2000

**Recherche et élimination des facteurs inhibiteurs de
croissance dans les élevages piscicoles en circuit fermé**

M. J.P. GUIRAUD	Professeur, Université MONTPELLIER II	Directeur de thèse et Président du Jury
M. J.P. BLANCHETON	Chercheur IFREMER	Examineur
M. M. COMPS	Directeur de Recherches, IFREMER	Examineur
Mme A.GRIMBERG	Responsable Recherche et Développement, AIR LIQUIDE	Examineur
M. L.HOFFMANN	Professeur à l'Université du LUXEMBOURG	Rapporteur
M. Y.MARTIN	Directeur de recherche à l'Institut Océanographique Paul RICARD	Rapporteur

0005882
02L05882
SISN54369

N040
LEO
R

UNIVERSITE MONTPELLIER II

--- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC ---

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER II

Discipline : Biochimie et Biologie Moléculaire
Formation Doctorale : Sciences des Aliments
Ecole Doctorale : Science et Procédé Biologiques et Industriels

présentée et soutenue publiquement
par

Noémie LÉONARD
Ingénieur ENSAM

le 29 Novembre 2000

RECHERCHE ET ELIMINATION DES FACTEURS INHIBITEURS DE CROISSANCE DANS LES ELEVAGES PISCICOLES EN CIRCUIT FERME

M. J.P. GUIRAUD	Professeur, Université MONTPELLIER II	Directeur de thèse et Président du Jury
M. J.P. BLANCHETON	Chercheur IFREMER	Examineur
M. M. COMPS	Directeur de Recherches, IFREMER	Examineur
Mme A. GRIMBERG	Responsable Recherche et Développement, AIR LIQUIDE	Examineur
M. L. HOFFMANN	Professeur à l'Université du LUXEMBOURG	Rapporteur
M. Y.MARTIN	Directeur de recherche à l'Institut Océanographique Paul RICARD	Rapporteur

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le ministère de l'Education National et de la Recherche du Luxembourg, qui en m'accordant une bourse de thèse (BRF 96/073) m'a permis de réaliser ce travail ; puis l'IFREMER et la Faculté des Sciences de Montpellier qui m'ont permis de réaliser mes expérimentations tant matériellement et qu'intellectuellement.

Je remercie Messieurs J.P. Guiraud et J.P. Blancheton pour leur aide, leur soutien et leurs conseils. Mes très sincères remerciements à Mesdames Aurélie Grimberg et Lucie Prost et à Monsieur Jean Marc Rabillier du centre de recherche Claude Delorme (Air Liquide), pour leur participation à cette étude et pour m'avoir communiqué leurs connaissances lors de nombreuses réunions de travail à Palavas. Que Madame Grimberg et Messieurs Guiraud, Blancheton, Comps, Hoffmann et Martin, soient également remerciés pour avoir aimablement accepté de participer au jury de soutenance.

Une thèse est une odyssée solitaire (Stamakis, 2001)...c'est vrai. Pourtant, beaucoup de noms se bousculent dans mon esprit au moment d'écrire ces lignes. Je ne vais pas faire de liste pour ne pas avoir à classer les gens et risquer d'en oublier. Disons que je remercie simplement les équipes ASC et Patho d'exister et que je regrette leurs retraités. Je remercie encore les quelques électrons libres qui attirés par le soleil, les blagues de Jean Luc, le café et les cigares sont venus nous tenir compagnie le midi.

Après bien sûr, je remercie ma famille et plus particulièrement Den's pour son soutien sans faille, nos chats et notre grenouille.

INTRODUCTION GENERALE	5
CHAPITRE 1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	8
1. LA MATIERE ORGANIQUE DANS LES CIRCUITS FERMES.	9
1.1. Le cycle de l'azote.	10
1.1.1. Les rejets solides.	
1.1.2. Les rejets dissous.	
1.1.3. L'activité bactérienne nitrifiante.	
1.2. Le cycle du carbone.	11
1.2.1. Les formes d'excrétion carbonée des poissons.	
1.2.2. L'activité bactérienne.	
1.2.3. Les phénomènes de coloration des eaux d'élevage piscicole.	
1.2.4. Définitions des substances humiques.	
1.2.5. Origines des substances humiques.	
1.2.6. Propriétés chimiques des substances humiques (SH).	
1.2.7. Elimination des substances humiques.	
2. LA BACTERIOLOGIE DES CIRCUITS FERMES PISCICOLES.	20
2.1. Les populations bactériennes autotrophes.	20
2.1.1. Les mécanismes de la nitrification.	
2.1.2. Application aux élevages piscicoles.	
2.2. Les populations bactériennes hétérotrophes.	23
2.2.1. Etude quantitative.	
2.2.2. Etude qualitative.	
2.3. Le contrôle des populations bactériennes en milieu aquatique.	26
3. UTILISATION DES UV ET DE L'OZONE EN PISCICULTURE.	28
3.1. Le rayonnement UV.	28
3.2. L'ozone.	30
3.2.1. La réactivité de l'ozone.	
3.2.2. Les modes d'action de l'ozone.	
3.2.3. Les doses d'ozone appliquées (eau douce et eau de mer).	
3.2.4. La tolérance à l'ozone.	
3.2.5. L'élimination de l'ozone et des OTR.	
4. LA CROISSANCE DU BAR.	36
5. MODELISATION DU COMPARTIMENT BACTERIEN.	37
5.1. La croissance bactérienne.	37
5.2. Les biofilms bactériens.	38
5.3. La modélisation du fonctionnement des biofilms bactériens dans les réseaux d'eau potable et de traitement des eaux.	43
5.3.1. Les deux types de modèles.	
5.3.2. Données hydrauliques.	
5.3.3. Le modèle de Bois et <i>al.</i> , (1997).	
5.4. Quantification des phénomènes pris en compte dans la modélisation bactérienne en milieu aquacole.	46
5.4.1. Les constantes de fixation et de détachement.	
5.4.2. La constante de mortalité des bactéries.	
5.4.4. Les inhibiteurs de croissance.	
CHAPITRE 2. MATERIEL ET METHODES	53
1. LES CIRCUITS EXPERIMENTAUX UTILISES.	54
1.1. Descriptions générales.	54
1.1.1. Le circuit pilote de 24 m ³ .	

1.1.2. Les circuits expérimentaux de 6 m ³ .	
1.2. Les différents éléments du circuit.	57
1.2.1. Le système d'alimentation.	
1.2.2. La filtration mécanique.	
1.2.3. La filtration biologique.	
1.2.4. La colonne de dégazage.	
1.2.5. Maintien du pH et de la température.	
1.2.6. Système d'ozonation.	
2. LES POISSONS.	61
2.1. Origine et conditions d'élevage des poissons.	61
2.2 Les paramètres zootechniques mesurés.	62
2.2.1. L'évolution du poids moyen.	
2.2.2. Le taux d'alimentation journalier (TAJ).	
2.2.3. L'indice de conversion alimentaire net (IC).	
2.2.4. Le taux de croissance spécifique ou taux de croissance journalier (TCJ).	
2.3. Observation des branchies.	64
2.3.1. Histologie classique.	
2.3.2. Observations en microscopie électronique (transmission).	
2.4. L'alimentation.	64
3. ETUDE DES POPULATIONS BACTERIENNES HETEROTROPHES.	65
3.1. Les Prélèvements.	65
3.1.1. Les bactéries circulantes.	
3.1.2. Les bactéries fixées.	
3.2. Revivification.	66
3.3. Isolement.	66
3.4. Numération.	66
3.5. Expression des résultats.	67
3.6. Caractérisation des populations dominantes.	67
3.7. Observation du garnissage : microscopie électronique (balayage).	67
4. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES.	68
4.1. Les paramètres physico-chimiques des eaux.	68
4.2. Etude des substances humiques.	69
4.2.1. Extraction.	
4.2.2. Evaluation de la masse molaire (MM).	
4.2.3. Caractéristiques optiques.	
4.2.4. Analyse élémentaire des SH.	
5. L'ANALYSE STATISTIQUE.	71
6. LES OUTILS INFORMATIQUES UTILISES POUR LA MODELISATION.	71
CHAPITRE 3. LES SUBSTANCES D'ACCUMULATION DANS LES CIRCUITS FERMES PISCICOLES.	73
1. CARACTERISATION DES SUBSTANCES HUMIQUES.	74
1.1. Rendement d'extraction.	75
1.2. Propriétés optiques.	77
1.3. Chromatographie d'exclusion.	78
1.4. Analyse élémentaire des SH.	79
1.5. Correspondance entre carbone organique dissous et absorbance à 300 nm due aux substances humiques.	79
2. CARACTERISATION CHIMIQUE DES EAUX D'ELEVAGE EN CIRCUIT FERME PISCICOLE.	79
2.1. L'accumulation d'azote minéral.	80

2.2. L'accumulation des phosphates.	81
2.3. L'accumulation du carbone organique dissous et des substances humiques.	81
2.3.1. Le carbone organique dissous (COD).	
2.3.2. Les substances humiques (SH).	
3. DISCUSSION.	83
3.1. Le carbone organique dissous.	83
3.2. L'azote minéral.	86
3.3. Le Phosphore minéral.	87
4. CONCLUSION.	89
CHAPITRE 4. ETUDE DES POPULATIONS BACTERIENNES HETEROTROPHES	90
1. ETUDE DES BACTERIES HETEROTROPHES DANS UN CIRCUIT FERME PISCICOLE.	91
1.1. Distribution spatiale: tendances générales.	91
1.2. Influence du taux de renouvellement en eau sur les bactéries hétérotrophes.	94
1.2.1. Essais sur le circuit pilote.	
1.2.2. Influence des apports d'eau neuve sur le nombre de bactéries fixées et circulantes dans les élevages piscicoles.	
1.3. Influence de la quantité d'aliment distribuée et de l'indice de conversion des poissons sur les populations bactériennes.	96
1.4. Effet de la lampe UV sur les populations bactériennes.	97
1.5. Observation du garnissage du filtre biologique.	98
2. CARACTERISATION DES BACTERIES.	98
3. DISCUSSION.	101
4. CONCLUSION.	106
CHAPITRE 5. ETUDE DE L'INFLUENCE DU TAUX DE FERMETURE SUR LA CROISSANCE DU BAR.	107
1. COMPARAISON DES PERFORMANCES ZOOTECHNIQUES DU BAR A DIFFERENTS DEGRES DE FERMETURE.	108
1.1. Comparaison de la croissance du bar dans deux circuits recirculés : l'un très ouvert et l'autre fermé.	108
1.2. Comparaison de la croissance du bar à deux degrés de fermeture importants.	110
2. DISCUSSION ET CONCLUSION.	112
CHAPITRE 6. ESSAIS D'OZONATION.	114
1. L'EFFET DES OXYDANTS TOTAUX RESIDUELS (OTR) SUR LES PARAMETRES CHIMIQUES DES EAUX.	116
1.1. Les concentrations en oxydants totaux résiduels (OTR).	116
1.2. Relation entre oxydants totaux résiduels et température.	117
1.3. Relations oxydants totaux résiduels et quantité d'aliment distribuée.	117
1.4. Influence des oxydants totaux résiduels sur le COD.	118
1.5. Influence des oxydants totaux résiduels sur les substances humiques.	119
2. EFFET DES OXYDANTS TOTAUX RESIDUELS SUR LES BACTERIES DU CIRCUIT.	121
3. PERFORMANCES ZOOTECHNIQUES DES POISSONS.	122
4. ETUDE DES BRANCHIES DE BAR SOUMIS AU TRAITEMENT D'OZONATION.	124
4.1. Observations des Branchies des poissons témoins.	125

4.2. Effets des faibles concentrations en oxydants totaux résiduels sur les branchies.	125
4.3. Effets des fortes concentrations en oxydants totaux résiduels sur les branchies.	129
5. DISCUSSION.	129
5.1. Effets du traitement d'ozonation sur la chimie des eaux d'élevage.	129
5.2. Effet du traitement d'ozonation sur les performances des poissons.	131
5.3. Effet de l'ozone sur les branchies des poissons.	131
6. CONCLUSION.	132
CHAPITRE 7. ESSAI DE MODELISATION DE LA DYNAMIQUE DE CROISSANCE DES POPULATIONS BACTERIENNES HETEROTROPHES.	134
1. FONDEMENTS DU MODELE.	135
1.1. Les Variables d'état.	136
1.2. Les différents flux.	136
1.3. Les variables forçantes.	138
1.4. Les équations d'état.	138
1.5. Le mode d'intégration.	138
2. CHOIX DE LA DISTRIBUTION PRIMAIRES DES DIFFERENTS PARAMETRES.	138
2.1. Paramétrage de la croissance bactérienne.	138
2.2. Les apports de carbone.	141
2.3. La consommation du carbone.	142
2.4. Les constantes d'équilibre entre les bactéries fixées et les bactéries libres dans le filtre biologique.	142
2.4.1. Constante de détachement des bactéries fixées sur le garnissage du filtre biologique.	
2.4.2. La fixation des bactéries libres sur le garnissage du filtre biologique.	
3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.	145
3.1. Le modèle bactérien.	145
3.2. Le modèle général.	146
CONCLUSION GENERALE	147
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	152
ANNEXES	166

INTRODUCTION GENERALE

La pisciculture en système recirculé est une technique aquacole nouvelle, basée sur des traitements mécaniques, biologique et physico-chimiques de l'eau d'élevage de façon à pouvoir la réutiliser plusieurs fois, ce qui permet de réduire les apports d'eau. Cette technique a été développée, dans un premier temps en eau douce, pour des poissons peu exigeants en qualité d'eau (Carpes, Anguilles, Tilapia...); c'est à dire pour des animaux vivant habituellement dans des eaux stagnantes, souvent très chargées en matières dissoutes et en matières en suspension, et pauvres en oxygène. Cette faible exigence en qualité d'eau a facilité l'émergence de ces techniques aquacoles dès les années 1970 (C.T.G.R.E.F., 1974; Petit et Ferron, 1975).

Le développement de l'aquaculture marine en cage ou à terre pour les phases de pré-grossissement (des alevins sevrés à 50 g) et de grossissement (de 50 g au poids de commercialisation) a créé de nouveaux besoins en matière de techniques aquacoles spécifiques à l'eau de mer. En effet, une production constante et de qualité égale toute l'année, nécessite une production maîtrisée d'alevins, de façon à se soustraire des aléas des approvisionnements issus de la pêche. La première exigence implique une connaissance du cycle de reproduction des espèces à élever et la possibilité de décaler les pontes dans le temps par rapport à la période de reproduction naturelle. Le "décalage des pontes" est réalisé en modifiant la photopériode et la température d'élevage des géniteurs (Devauchelle, 1988). Ce contrôle de la température implique des coûts de chauffage importants qui ont poussé à la mise au point des premiers systèmes recirculés en eau de mer adaptés à l'élevage des géniteurs. Ces circuits recirculés ont des contraintes techniques assez peu importantes car les élevages se font à faibles densités de poissons (5 kg de poisson par m³) et à des taux de renouvellements en eau qui restent importants (400 % par jour en moyenne). La mise au point de l'élevage larvaire a poussé les techniques aquacoles vers une plus grande maîtrise de la qualité des eaux, tant au niveau physique (filtration) que chimique (nitrification).

Par la suite, de nouvelles exigences sont apparues, liées à des préoccupations d'ordre économique, qui ont entraîné de nouveaux efforts et des progrès zootechniques (Billard, 1998). Ces contraintes sont d'abord la nécessité de pouvoir installer des piscicultures à terre et/ou sur des sites éloignés de la mer, hors de la zone côtière, où la pression touristique est telle que le nombre maximal de sites de production exploitables est atteint (en France), ensuite, la nécessité de produire le plus près possible des centres de consommation et donc de s'affranchir des apports d'eau neuve et troisièmement de réduire au maximum les rejets d'eau de la pisciculture afin de pouvoir les retraiter et de rejeter une eau "épurée" en nitrates et en phosphates, ou même de ne pas rejeter cette eau mais de la réincorporer dans les systèmes d'élevage. Ces trois contraintes vont dans le sens d'une diminution très importantes des

apports d'eau. Il faut par ailleurs maintenir une qualité d'eau permettant aux poissons d'avoir les meilleures performances de croissance possibles.

Cette thèse a pour objectif l'étude des mécanismes biologiques impliqués dans les processus de traitement de l'eau d'élevage des circuits fermés piscicoles. Le traitement des eaux est basé sur une filtration mécanique placée juste après les bassins d'élevage qui élimine en moyenne 50 à 60 % des matières en suspension (Blancheton, 2000) et sur une filtration biologique dans un filtre dit « biologique » où se déroule la nitrification sous l'action de bactéries dites autotrophes nitrifiantes. A côté de ces bactéries autotrophes se développent souvent en symbiose, parfois en concurrence, des bactéries hétérotrophes qui consomment le carbone organique. Les bactéries hétérotrophes des systèmes piscicoles ont été assez peu étudiées. Elles ont pourtant une influence importante sur la qualité de l'eau d'élevage, car d'une part elles consomment de l'oxygène dans le filtre biologique et d'autre part produisent des molécules carbonées qui s'accumulent dans l'eau (au même titre que les nitrates). Par ailleurs, les populations de bactéries pathogènes font partie de leur groupe. L'étude de ces bactéries hétérotrophes implique donc l'étude du cycle du carbone et de ses formes d'accumulation qui vont apparaître au fur et à mesure de la diminution du renouvellement en eau dans les circuits recirculés piscicoles.

Nos travaux contribueront à déterminer s'il existe des facteurs limitants, en terme de performance biologique (croissance, indice de conversion alimentaire) du cheptel, quand les apports d'eau dans le système d'élevage sont les plus faibles possible. Pour cela, nous avons caractérisé tant au niveau chimique que bactériologique les eaux d'élevage en fonction du degré de fermeture des circuits (fermeture mesurée par le rapport "Ingéré" sur eau neuve). Compte tenu du peu de connaissances concernant les bactéries hétérotrophes dans les circuits fermés et de l'importance de celles-ci au niveau de la qualité des eaux et des bactérioses qu'elles peuvent causer, nous avons d'abord cherché à caractériser le "compartiment bactéries hétérotrophes". Nous avons ensuite déterminé si ces populations bactériennes sont stables en terme quantitatif et qualitatif, et quels sont les mécanismes qui influencent le nombre et le type de bactéries présentes. Nous avons ensuite fait des essais de fermeture des circuits en étudiant plusieurs degrés de fermeture de façon à caractériser le milieu d'élevage (chimiquement et bactériologiquement) et de repérer si les performances des poissons sont modifiées par le degré de fermeture du circuit. Enfin, des essais d'ozonation ont été réalisés afin d'éliminer les substances d'accumulation de la matière carbonée. Les données obtenues seront utilisées afin d'établir un modèle dynamique du fonctionnement du compartiment bactérien du circuit fermé.

CHAPITRE 1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LA MATIERE ORGANIQUE DANS LES CIRCUITS FERMES.

Un système d'élevage de poissons peut être considéré comme un réacteur dans lequel sont introduits : des alevins, de l'aliment, de l'eau, du gaz et qui produit des poissons et des déchets sous forme particulaire et dissoute.

La forme particulaire est constituée d'une partie parfois non négligeable de l'aliment qui n'a pas été ingéré et des fèces. En ce qui concerne l'aliment non ingéré, sa quantité qui peut varier entre 1 et 40 % de l'aliment distribué (Gowen et Bradburry, 1987 ; Storebakken et Austreng, 1987 ; Thorpe et *al.*, 1990 ; Van der Meer, 1997). Ces pertes dépendent (1) de l'espèce élevée, (2) de la méthode d'élevage, (3) du mode de distribution de l'aliment et (4) du type d'aliment lui-même (Warner-Hansen, 1982 ; Wu, 1995). Dans le cas d'élevage en eau recirculé, l'utilisation de systèmes d'auto-alimentation permet de réduire fortement le gaspillage (Covès et *al.*, 1998) et de le mesurer par récupération dans des pièges à particules.

L'estimation de la quantité de fèces produite est difficile car elle est influencée par de nombreux facteurs. Klontz et *al.*, (1978) proposent une première formule, exprimant la quantité de matières en suspension (MES) apportée par les fèces:

$$\text{MES}_{\text{fèces}} = 0,95 \cdot (1 - 1/ \text{IC}) \cdot A$$

$\text{MES}_{\text{fèces}}$:Matières en suspension dues aux fèces, exprimées en kg.

A : quantité d'aliment (matière sèche) distribuée en kg

IC : indice de conversion par rapport à l'aliment distribué sans unité (g/g)

IC : quantité d'aliment distribuée / gain de biomasse.

Cette formule évalue à 10 % de l'aliment la quantité de fèces, pour un IC de 1, ce qui paraît très sous estimé. Le CEMAGREF (1983) reprend ces résultats et des observations de terrain pour proposer une nouvelle formule:

$$\text{MES}_{\text{fèces}} = (33 \times \text{IC} - 20) \times A / 100$$

La forme dissoute est constituée par l'excrétion branchiale et urinaire des poissons. Une partie de la matière particulaire est transformée en molécules dissoutes par les bactéries présentes dans le circuit, qui par ailleurs utilisent certaines substances dissoutes pour constituer la zooglyée (particulaire).

1.1. Le cycle de l'azote.

1.1.1. Les rejets solides.

La proportion d'azote excrétée dans les fèces est constituée par la fraction non-ingestible des protéines de l'aliment. Dosdat et *al.*, (1996) constatent que l'azote fécal de 5 espèces de téléostéens de 10 à 100 g (Bar- *Dicentrarchus labrax*, Turbot- *Scophthalmus maximus*, Daurade- *Sparus aurata*, Truite Fario- *Salmo trutta fario* et Truite arc en ciel- *Onchorynchus mykiss*) varie entre 6 et 20 % de l'azote ingéré. Toutefois, ces auteurs précisent que 13 à 78 % de cet azote est sous forme dissoute dans les fèces et peut-être libéré par simple lessivage.

1.1.2. Les rejets dissous.

La plupart des Téléostéens, dont le bar (*Dicentrarchus labrax*) sont ammonotéliques et l'excrétion de l'ammoniac se fait par simple diffusion à travers les branchies (Randall et Wight, 1987). Pour le bar, ces rejets d'azote ammoniacal représentent entre 80 et 87 % des rejets d'azote dissous (Guerin-Ancey, 1976), le reste étant principalement de l'urée (Forster et Goldstein, 1969) à laquelle s'ajoutent de nombreux types de molécules organiques: acide urique, créatine, acides aminés (Kaushik, 1990).

1.1.3. L'activité bactérienne nitrifiante.

L'ammoniac est le principal produit d'excrétion azotée, mais sa forme non ionisée (NH_3) est toxique à relativement basse concentration puisque la croissance du Bar est ralentie dès $0,33 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NH_3 (Pearson-Le Ruyet et Boeuf, 1998). La mise en place des systèmes recirculés a donc nécessité d'utiliser la nitrification bactérienne, processus naturel réalisé par les bactéries dites nitrifiantes (chapitre 1., § 2.1.). Elles transforment l'ammoniac en nitrates, moins toxiques pour tous les poissons, puisque chez les salmonidés pour lesquels des études ont été réalisées, la concentration létale pour 50 % de individus est de $1300 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NO_3 soit $293 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de N-NO_3 (Pearson-Le Ruyet et Boeuf, 1998). Les autres produits d'excrétion azotée organique sont utilisés par les bactéries hétérotrophes du circuit, qui produisent de l'ammoniac qui est transformée dans le processus de nitrification. Les nitrates sont donc la

forme d'accumulation de l'azote dans les circuits fermés. Leur concentration dépend de la quantité d'aliment ingérée par les poissons et du renouvellement en eau dans le circuit. Certains auteurs ont toutefois montré que la production de nitrates par le circuit n'est pas constante et qu'elle est fonction de la fermeture du circuit (Pagand et al., 2000 et Heinen, 1996). Pagand et al., (2000) a trouvé une relation de type exponentiel entre le taux de renouvellement du bassin Q et la production azotée par jour Γ_N dans un élevage de bar en circuit fermé.

$$\Gamma_N = 45,7 \times Q^{0,23}$$

Avec Q : le nombre de remplacement par jour de l'eau d'élevage,

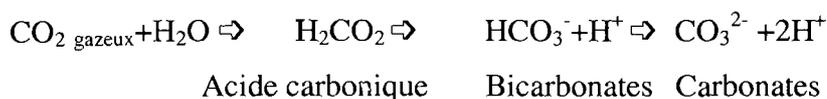
Γ_N : le pourcentage d'azote apporté au système par jour.

1.2. Le cycle du carbone.

1.2.1. Les formes d'excrétion carbonée des poissons.

Les connaissances concernant le cycle du carbone sont beaucoup moins abondantes que celles concernant le cycle de l'azote. Les poissons excrètent le carbone sous forme solide via les fèces, dont la quantité et la composition dépendent de la digestibilité et de la nature des substances carbonées contenues dans l'aliment. Les formes d'excrétion dissoute du carbone sont l'urée (Forster et Goldstein, 1969), le CO_2 et de nombreux types de molécules organiques (Kaushik, 1990).

Le CO_2 est le sous produit de la respiration des poissons. Le CO_2 gazeux est en équilibre avec la pression partielle du CO_2 de l'atmosphère, les réactions qui s'enchaînent sont les suivantes :



Cette suite de réaction montre que le dioxyde de carbone excrété par les poissons a tendance à faire baisser le pH de l'eau d'élevage. d'autre part, on observe fréquemment des phénomènes de sursaturation en CO_2 gazeux que l'on tente de diminuer par dégazage à travers des colonnes de désaturation (Blancheton, 2000). La forme CO_3^{2-} se complexe, à pH basique, avec les cations présents dans l'eau, en premier lieu le calcium, qui forme des précipités carbonatés. L'urée se retrouve très rapidement sous forme de CO_2 et d'ammonium, qui rentrent dans les schémas de réaction décrits précédemment.

1.2.2. L'activité bactérienne.

Les bactéries autotrophes du circuit utilisent le CO_2 comme source de carbone (chapitre 1., § 2.1.), alors que les bactéries hétérotrophes utilisent le carbone organique (chapitre 1. § 2.2.). Les cellules bactériennes, en se lysant, libèrent à leur tour dans le milieu différentes formes de carbone organique (triglycérides provenant des membranes lipidiques, ADN...).

1.2.3. Les phénomènes de coloration des eaux d'élevage piscicole.

Le changement de couleur des eaux d'élevage piscicole en système recirculé a depuis longtemps été observé (Otte et *al.*, 1977; Wickins, 1985). Parallèlement, on a souvent utilisé l'absorption dans l'ultra violet (UV) pour mesurer la pollution organique des bassins d'élevage aquacole (Otte et *al.*, 1977, Hirayama et *al.*, 1988, Takeda et Kyiono, 1990). Ces études montrent qu'il existe une étroite corrélation entre la coloration des eaux, l'absorption dans l'UV et la concentration en carbone organique dissous dont la nature est proche des substances humiques (couramment appelées substances jaunes en raison de la couleur qu'elles donnent à l'eau).

Otte et *al.*, (1977) ont décrit la présence de substances jaunes, caractérisées par un maximum d'absorbance à 315 nm, en élevage piscicole recirculé. Les propriétés optiques et chimiques de ces substances leur font penser qu'elles contiennent des mélanoides, c'est à dire de longues molécules en chaîne contenant des acides aminés et des sucres réducteurs.

Hirayama et *al.*, (1988) ont mené leurs expériences parallèlement en eau douce et en eau de mer. Ils ont fait les deux observations suivantes : (1) Il existe une relation entre l'absorbance à 260 nm, la quantité de carbone organique dissous et les apports de nourriture. On retrouve le même type de relation entre la fluorescence (longueur d'onde d'excitation à 350 nm et émission à 430 nm), le carbone organique dissous et les apports de nourriture. Et (2) le poids moléculaire de plus de la moitié de ces substances organiques (déterminé par ultrafiltration) est de l'ordre de 10^4 .

Par la suite, ces substances ont été extraites des eaux d'aquarium par passage de l'eau sur des résines chélatantes (greffées Fe^{3+}) capables de fixer les substances humiques (Takeda et Kiyono, 1990). Les caractéristiques de ces substances sont alors les suivantes (toutes ces propriétés seront détaillées dans le chapitre consacré aux substances humiques (chapitre 1., § 1.2.4.) :

- une absorbance dans l'UV, en croissance continue, jusqu'à 200 nm ;
- une fluorescence : longueur d'onde d'émission aux alentours de 430 – 440 nm pour une excitation à 350 nm;
- un poids moléculaire variant entre 700 et 1600 ;
- un rapport de densité optique mesurée à 465 et 665 nm: E_4/E_6 , indicateur du degré de condensation des substances humiques (Rashid, 1977) de 7,5. Cette valeur, très élevée par rapport aux valeurs correspondant aux acides humiques des sédiments côtiers de surface (comprises entre 2 et 5) indique le faible degré de condensation de ces substances jaunes. Ce rapport les rapproche plutôt des acides fulviques.

Schuster (1994) a cherché à savoir si les farines de poisson contenues dans les aliments sont responsables de la coloration de l'eau des circuits fermés et, dans ce cas, si cette coloration est en relation avec la prise de nourriture. Quatre régimes alimentaires différents ont été testés : le premier ne contient ni farine de poissons ni poissons, les deux suivants ne contiennent que de la farine de poissons mais en quantité différente et le dernier contient du poisson haché. La coloration de l'eau d'élevage est évaluée en mesurant son absorbance à 436 nm. Il s'avère que seuls les régimes alimentaires contenant des farines de poissons ont provoqué une coloration de l'eau, coloration proportionnelle à la quantité de farine. Dans cet essai, il a été montré qu'on ne pouvait attribuer la coloration de l'eau aux substances humiques ou aux procédés de transformation dans les filtres biologiques comme le suggèrent Bovendeur *et al.*, (1987) et Muir (1982), car les régimes ne contenant pas de farine de poissons n'ont pas coloré l'eau. D'après Pogorny 1981 ce sont les acides gras polyinsaturés contenus dans les huiles des farines de poissons qui seraient à l'origine du brunissement des eaux.

Par ailleurs Hirayama *et al.*, (1988) remarquent que la fréquence de lavage du filtre biologique influence la quantité de substances jaunes présentes dans les eaux d'élevage : plus on lave fréquemment le filtre biologique, moins les substances jaunes s'accumulent. Cela pourrait indiquer que les bactéries du filtre biologique jouent un rôle important dans la genèse des substances jaunes. Les substances jaunes accumulées ne représentent que 3,2 % de la quantité totale d'aliment apporté au système.

1.2.4. Définitions des substances humiques.

Les matières humiques sont en premier lieu définies comme des substances ayant une absorbance qui diminue avec l'augmentation de la longueur d'onde, sans qu'il existe de véritable maximum (Kalle, 1966). Ces matières, qui sont une forme stable de la matière organique, seraient synthétisées à partir des produits précipités d'organismes vivants (Skopintsev, 1959).

Les substances humiques marines comprennent la majeure partie du carbone organique dissous non caractérisé des océans et sont pressenties, de part leur importance quantitative, de jouer un rôle important dans les processus chimiques et microbiologiques en eau de mer (Amador et *al.*, 1990). Pour Ischiwatari (1992), « les SH sont définies comme des molécules organiques de poids moléculaire élevé qui peuvent être caractérisées par leur couleur qui va du jaune au brun foncé... . La fraction insoluble dans l'eau à pH inférieur à 2 est appelée acide humique alors que les acides fulviques sont solubles quel que soit le pH ». Amador et *al.*, (1990) les définissent comme des substances carbonées dissoutes et hydrophobes ayant des propriétés fluorescentes. Ils ajoutent concernant les méthodes d'étude que : « actuellement, il n'existe pas de méthode standard utilisée pour l'extraction des substances humiques. Etant donnée la grande diversité des structures chimiques concernées et la complexité des propriétés physiques et chimiques que possèdent ces composés, il est douteux de développer une méthode simple, universelle et satisfaisante. Par exemple, la fraction des substances humiques responsable des propriétés photochimiques et photophysiques peut être différente de la fraction responsable des propriétés de complexation des métaux, des interactions hydrophobes et hydrophiles, des interactions biologiques, des réactions chimiques avec les composés xénobiotiques, des phénomènes de sorption ». La définition des substances humiques est donc assez vague du fait que (1) elles ne sont pas caractérisées par une formule chimique précise et que (2) des moyens d'extraction et de mesures très différents ont été jusqu'à présent utilisés. Le tableau n°1.1. présente les différentes méthodes utilisées et les milieux à partir desquels elles sont extraites.

Tableau n°1.1. Définition et extraction des substances humiques.

Auteurs	Absorbance (nm) λ	Fluorescence (nm)		Extraction (type de résine)	Type d'eau
		$\lambda_{\text{excitation}}$	$\lambda_{\text{émission}}$		
Kieber et <i>al.</i> , 1997		360	490		solution en eau de mer de SH (Aldrich ou Fisher Scientific)
Miller and Moran (1997)		360	490	amberlite XAD-8	eau de mer
Misra et <i>al.</i> , 1996		340	498.6		solution eau distillée de SH (Aldrich)
Lund et Hongve (1994)	254				eau douce naturelle (Baerum*)
Gjessing et Källqvist (1991)	254				eau douce naturelle (Hellerud*)
Amador et <i>al.</i> , 1990	250	360	490		
Takeda et <i>al.</i> , (1990)	en augmentation de 500 to 200	350	450	chélatante (greffée Fe ³⁺)	eau de mer d'aquarium
Hirayama et <i>al.</i> , 1983	260	360	430		eau de mer et eau douce d'aquarium
Gillbricht (1980)	230 to 250				eau de mer
Otte et <i>al.</i> , 1977	315				eau douce d'élevage piscicole
Algrem et <i>al.</i> , 1975				chélatante (greffée Fe ³⁺)	eau de mer naturelle (Hanö Bay*)
Sieburth et Jensen, 1970	450				Eau de mer naturelle

* origine de l'eau.

1.2.5. Origines des substances humiques.

Plusieurs origines sont proposées pour les substances humiques:

- La condensation de polyphénols avec des carbonates et du matériel protéique issu d'exsudat d'algues marines du littoral (Sieburth et Jensen, 1970) ;

- Le passage aux substances humiques à partir d'acides gras polyinsaturés, via les acides fulviques (fig. n°1.1., Harvey et *al.*, 1983). En effet d'après ces auteurs, la faune et la flore marine sont une abondante source d'acides gras sous la forme de glycérides. Ces acides gras, libérés dans une eau oxygénée et exposée à la lumière, pourraient subir une réticulation à l'origine des liaisons intermoléculaires. Kieber et *al.*, 1997, ont montré que les acides gras polyinsaturés, libres ou dans les triglycérides, réagissent en présence de lumière par autooxydation pour former des aldéhydes et des acides ω - oxocarboxylique (chaîne carbonée ayant une fonction carboxylique et une fonction aldéhyde en bout de chaîne). Les fonctions aldéhydes ont un rôle important de par la réactivité de leurs fonctions vis à vis de l'ammoniac et des amines, ce qui permet une incorporation de l'azote dans la structure des acides humiques.

- La détérioration des cellules du phytoplancton et des bactéries libère des biomolécules précurseurs des substances humiques (Ishiwatari, 1992). Dans ce modèle, toutes les molécules biochimiques (protéines, glucides et lipides) participent à la formation des substances humiques et la formation de ces substances commence dès la lyse des cellules bactériennes et algales. Les caractéristiques des substances humiques sont acquises dès cette étape, reflétant ainsi les constituants organiques des cellules de départ. Ce seraient des réactions du type de réaction Maillard (entre fonction amine et carbonyle) qui se produiraient entre les biopolymères non biodégradables, les polymères partiellement dégradés par les bactéries et les molécules produites par l'activité bactérienne.

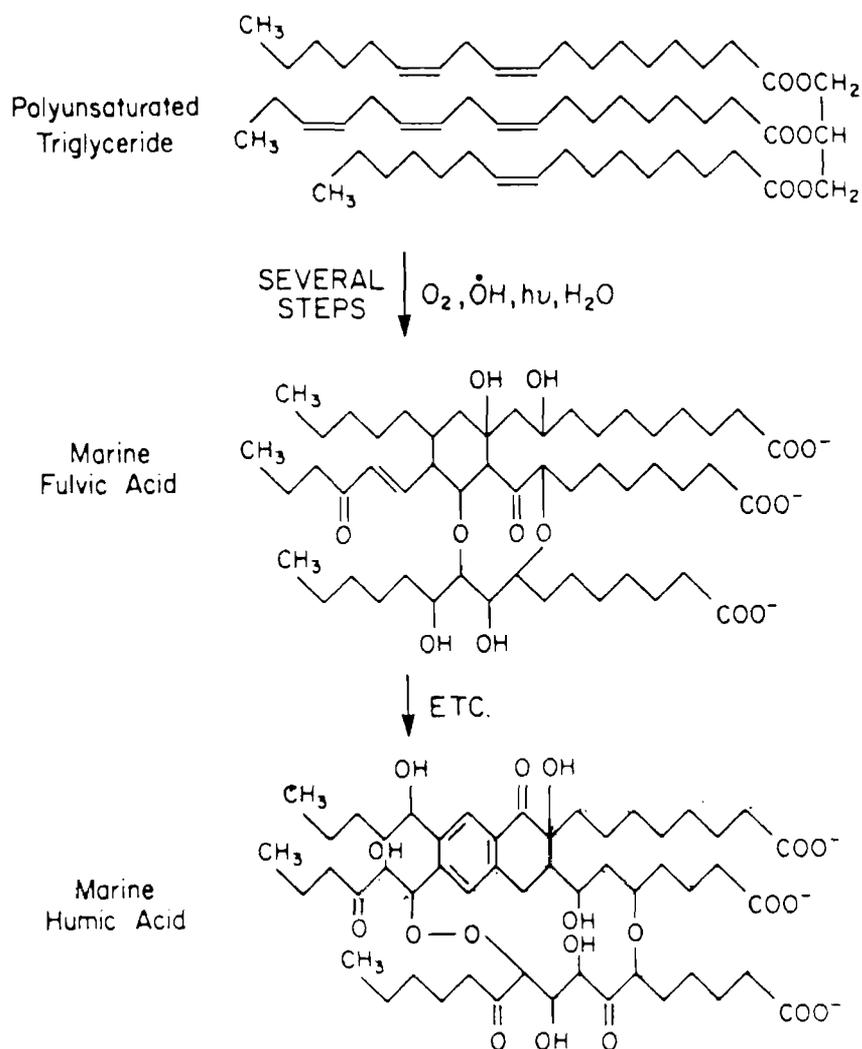


Figure n°1.1. Formation des Substances humiques marines (Harvey et *al.*, 1983).

1.2.6. Propriétés chimiques des substances humiques (SH).

Biodégradabilité:

En ce qui concerne la biodégradabilité des substances humiques, les avis ont été très partagés. Aujourd'hui, on s'accorde à dire que les substances humiques sont biodégradables mais qu'elles le sont difficilement. En effet, elles sont en partie composées de polymères non dégradables et leur taille les rend moins facilement utilisables qu'un substrat de petite taille. Elles peuvent tout de même jouer un rôle important en tant que facteur participant à la production primaire, notamment par la source d'azote qu'elles représentent (Kieber et *al.*, 1997). Le facteur vitesse d'utilisation doit être pris en compte : en effet Moran et Hodson (1994), farouches défenseurs de la biodégradabilité des substances humiques, reconnaissent

que seulement 3 à 11 % des substances humiques récupérées dans des mangroves sont biodégradables en 5 jours, et ce dans des cultures où elles sont la seule source de carbone et d'azote. Les substances humiques ne sont pas directement utilisables par les organismes, mais peuvent être hydrolysées en molécules plus petites par des enzymes bactériennes extracellulaires et prendre alors part à la chaîne alimentaire (Ogura, 1977). D'autres études sur la mesure du carbone organique assimilable (COA) montrent que les eaux riches en substances humiques sont celles qui ont le plus faible pourcentage de COA (Van der Kooij et al., 1982; Servais et al., 1987).

Pour conclure, les substances humiques sont très peu assimilables, mais en l'absence de tout substrat, elles peuvent constituer le point de départ d'une production primaire. Dès que cette production a commencé, d'autres sources de carbone et d'azote apparaissent, qui sont alors utilisées préférentiellement aux SH.

Réaction avec des composés organométalliques et des polluants.

En environnement marin, beaucoup d'éléments traces sont en association avec des macromolécules organiques (substances humiques) pour former des composés organométalliques qui ont un rôle important dans la régulation des processus biogéochimiques (Torri et Torri, 1985). L'adsorption de ces métaux sur les particules solides se fait sans qu'il y ait échange d'ions. En effet, la plupart de ces particules (sous forme colloïdale) sont chargées négativement en surface (Ogura, 1977). En eau douce, Christman (1970) a montré que les substances humiques sont pour une part importante sous forme de chélates avec les métaux lourds.

Absorbance du rayonnement lumineux.

Suite à la diminution de la couche d'ozone qui provoque une augmentation du rayonnement UV-B atteignant la surface terrestre, de nombreuses études ont été menées sur l'effet des UV sur les SH. Il s'avère que les UV-C réagissent avec les SH pour former des composés oxydants comme des peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) et d'autres types de peroxydes, de l'oxygène moléculaire, des radicaux hydroxyles (OH^\bullet). Ces composés oxydants ont un effet (1) germicide sur les bactéries : 60 % de mortalité immédiate selon Lund et Hongve (1994) et (2) inhibiteur de la croissance algale (Gjessing and Källqvist, 1991).

Les UV décomposent les SH en molécules plus petites qui pourraient stimuler la croissance bactérienne (Lund et Hongve, 1994). Les radiations UV-B réduisent l'activité métabolique et enzymatique du bactérioplancton de la couche superficielle de la mer. Cet

effet est réversible en présence d'un rayonnement UV-A et/ou entre 400 et 450 nm (Kaiser et Herndl, 1997). En eau de mer, les bactéries de la couche supérieure sont aussi sensibles à ces radiations que celles des couches inférieures. La présence de SH, en absorbant une partie de ces radiations, atténuerait ces phénomènes.

Toxicité des SH sur les animaux d'élevage.

A de faibles concentrations, ni les précurseurs de substances humiques ni les substances humiques n'ont de toxicité sur des larves de Carrelet (*Pleuronectes platessa*) d'après Sieburth et Jensen (1969).

Des expériences sur des élevages de Tilapia (*Sarotherodon niloticus*) en eau douce ont montré que la croissance et l'indice de conversion alimentaire sont meilleurs dans les aquariums où la concentration en SH est la moins élevée. Compte tenu de la faible toxicité des nitrates, l'accumulation des SH pourrait être une des causes de l'arrêt de croissance des poissons élevés en circuit fermé (Hirayama et al., 1988).

Takeda et Kiyono (1990) ont montré que les SH inhibent le développement d'œufs d'huître (*Crassostrea gigas*) à partir de 100 mg.l⁻¹ de SH. A partir de 500 mg.l⁻¹, l'effet inhibiteur est très important et bloque la première division.

1.2.7. Elimination des substances humiques.

Deux grandes étapes sont généralement envisagées pour éliminer les substances humiques : la première a pour objectif de casser ces molécules à longues chaînes et au poids moléculaire élevé, en composés plus courts; la seconde a pour objectif de dégrader ces petites molécules par les bactéries.

Traitement lumineux.

Comme il a déjà été fait mention dans le paragraphe précédent le rayonnement UV, et plus particulièrement UV-C, peuvent photo-oxyder les SH (Gjessing and Källqvist, 1991).

Traitement à l'ozone.

L'ozone a des propriétés décolorantes qui ont déjà été utilisées dans des élevages piscicoles en eau douce (Otte et al., 1977 ; Rosenthal et al., 1978). Il s'agit d'un traitement en deux passages qui permet, pour une concentration en ozone comprise entre 6,8 et 10,4 mg.l⁻¹, une augmentation de la demande biologique en oxygène. Ceci indique que les substances peu

attaquables par les bactéries du biofiltre sont cassées en chaînes plus petites, alors biodégradables.

Fixation sur charbon actif.

La filtration des eaux d'élevage sur du charbon actif est une technique déjà utilisée pour décolorer les eaux (Schuster, 1994).

2. LA BACTERIOLOGIE DES CIRCUITS FERMES PISCICOLES.

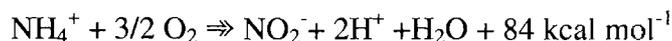
2.1. Les populations bactériennes autotrophes.

2.1.1. Les mécanismes de la nitrification.

Les bactéries responsables de la nitrification appartiennent à la famille des Nitrobacteriaceae (*Bergey's Manual*). Elles utilisent comme donneur d'électrons, l'ammoniac pour les NH_4^+ oxydantes (genre *Nitrosomonas*) et les nitrites pour les NO_2^- oxydantes (genre *Nitrobacter*). Elles sont donc chimolithotrophes. L'ammoniac et les nitrites sont leur seule source d'azote. Elles utilisent le CO_2 comme source de carbone et sont donc autotrophes. Le taux de croissance des bactéries nitrifiantes est particulièrement faible, il est de $0,026 \text{ h}^{-1}$ pour les *Nitrosomonas* et de $0,012 \text{ h}^{-1}$ pour les *Nitrobacter* (Hagopian et Riley 1998).

Le processus de nitrification est réalisé en deux étapes (Gibbs et Shiff, 1960) :

- oxydation de l'ammoniaque par les bactéries du genre *Nitrosomonas*



- oxydation des nitrites par les bactéries du genre *Nitrobacter*



Les bactéries nitrifiantes sont aérobies strictes mais, pour des teneurs faibles en oxygène, les NH_4^+ oxydantes peuvent utiliser les nitrites comme accepteur final d'électrons et générer alors du N_2O gazeux. Il s'agit alors d'un processus de dénitrification plutôt que d'une nitrification incomplète. Les bactéries NO_2^- oxydantes sont aussi capables d'utiliser les nitrites comme accepteur final d'électrons mais en ne formant que du monoxyde d'azote (NO gazeux) (Hagopian et Riley, 1998).

Les genres *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* et *Nitrosovibrio* sont capables de réaliser la première étape, et les genres *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrispira* et *Nitrospina* la seconde (Hagopian et Riley, 1994).

La deuxième étape du processus est l'étape limitante, c'est une réaction d'ordre 0:

$$[\text{NO}_2^-] = k t + [\text{NO}_2^-]_0 \quad \text{ou} \quad d[\text{NO}_2^-]/dt = k$$

Plusieurs facteurs interviennent dans la régulation de la seconde étape, dont notamment la teneur en oxygène du milieu (Lesel et Leffemberg, 1977). Le taux d'oxydation $d[\text{NO}_2^-]/dt$ est différent suivant la concentration initiale en substrat $[\text{NO}_2^-]_0$. L'oxydation de ce substrat est plus rapide aux concentrations fortes ($5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) qu'aux concentrations faibles ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Après un passage brutal à une concentration 10 fois supérieure à celle pratiquée auparavant, on observe un temps de latence puis une augmentation immédiate du taux métabolique. Tout se passe comme si intervenait, aux concentrations élevées, une microflore possédant une activité métabolique plus grande que celle se développant aux faibles concentrations. Cette hypothèse est partiellement corroborée par la variation quantitative de la microflore nitrifiante. Lesel et Leffemberg (1977) admettent qu'il y a adaptation de la population bactérienne avec disparition des cellules nitroso-sensibles et prolifération de celles possédant un meilleur équipement enzymatique. Pour de faibles concentrations en nitrites, la mise en place de l'activité nitrifiante est immédiate, mais à un taux faible, alors que pour des concentrations élevées, elle se fait après 5 à 6 jours mais à un taux plus rapide.

La dynamique des microflores des deux genres responsables de la nitrification (*Nitrobacter* et *Nitrosomonas*) a été étudiée en milieu aquatique. Il apparaît que seule la microflore fixée est métaboliquement active et que pour une microflore donnée, l'activité nitrifiante est proportionnelle à la surface colonisée. La microflore en suspension présente les caractéristiques physiologiques de la microflore fixée dont elle est issue, mais elle ne manifeste ces caractéristiques physiologiques qu'après fixation sur un support. Une modélisation de l'évolution de la flore en fonction du substrat a été proposée (Lesel, 1979) :

- (1) en l'absence de substrat, la microflore est en suspension dans l'eau et est physiologiquement inactive;
- (2) à l'apparition du substrat, il y a fixation sur un support et développement de nouvelles populations qui colonisent cette surface. Ces populations fixées présentent une activité nitrifiante après un certains temps de latence;

(3) à l'équilibre, l'activité métabolique est maximale et la multiplication est intense après colonisation complète des surfaces immergées. Les corps bactériens excédentaires sont libérés dans le milieu;

(4) en cas de variation de la quantité de substrat, toute la microflore active s'adapte et la microflore en suspension est remplacée par une microflore néoformée. Ceci dure probablement 2 à 3 jours pour les nitritantes et entre 5 et 6 jours pour les bactéries nitratantes, compte tenu de leur taux de croissance (Lesel et Leffemberg, 1977);

(6) à la disparition du substrat, les populations bactériennes perdent leur aptitude à manifester rapidement leurs capacités physiologiques. Elles se libèrent dans le milieu où on observe une augmentation des populations puis une rediminution progressive.

Les faibles **taux** de croissance des bactéries autotrophes expliquent qu'elles puissent être facilement dominées par les bactéries hétérotrophes. Cependant, les rendements de nitrification sont meilleurs dans un milieu contenant des matières organiques que dans un milieu entièrement minéral (Heinsbroek et Kamstra, 1990). La co-culture d'une souche de *Nitrosomonas* avec des bactéries hétérotrophes a pour effet d'augmenter soit son activité nitrifiante, soit son **taux de croissance** (Bianchi et *al.*, 1992).

2.1.2. Application aux élevages piscicoles.

En élevage de crevettes, Pillay et *al.*, (1989) montrent que l'introduction de crevettes dans le circuit fermé provoque l'apparition des bactéries nitrifiantes (NH_4^+ et NO_2^- oxydantes). Les populations passent par un maximum puis se stabilisent après respectivement 8 et 10 semaines. La population bactérienne nitrifiante dans le filtre biologique est de l'ordre de 10^6 cellules par cm^3 , environ 500 fois supérieure à la concentration des bactéries de ce type dans l'eau du bassin d'élevage.

Une autre étude réalisée sur les bactéries NH_4^+ -oxydantes (Jana et Roy, 1985) dans des bassins d'élevage de poissons confirme que le nombre de bactéries de ce type est plus important dans les sédiments que dans l'eau du bassin. La flore nitrifiante est plus abondante dans les circuits fermés que dans les piscicultures traditionnelles. On observe des variations saisonnières avec un maximum en hiver. On note une corrélation importante entre le nombre de bactéries NH_4^+ -oxydantes de l'eau et les différentes formes d'azote (NH_4^+ , NO_2^+ et NO_3^-), les phosphates, les sulfates et l'oxygène dissous. La nitrification se fait dans des boues sédimentant au fond des bassins. Le nombre de bactéries NH_4^+ -oxydantes dans ces boues est

proportionnel à l'azote total, à l'azote assimilable et aux phosphates. Dans les circuits recirculés, son abondance dépend de la charge en poissons. Dans un filtre biologique immergé, en présence de carbone organique et de bactéries hétérotrophes, les rendements de nitrification obtenus sont de l'ordre de $0,2 \text{ kg de N}\cdot\text{m}^{-3}$ de garnissage·jour⁻¹, la porosité du garnissage étant de 60 % (Covès et Gasset, 1996).

2.2. Les populations bactériennes hétérotrophes.

Si les populations bactériennes nitrifiantes des piscicultures en système recyclé ont été beaucoup étudiées, il n'en est pas de même pour les populations hétérotrophes auxquelles peu d'études ont été consacrées. De plus, les conditions expérimentales influent de façon considérable sur les résultats, ce qui empêche de tirer des conclusions précises quant à ces flores bactériennes. Les variations peuvent se situer à différents niveaux du système de traitement des eaux du circuit selon que l'on utilise de l'eau douce ou de mer, selon les espèces élevées et la charge du bassin d'élevage qui peut varier entre quelques $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ à plus de $150 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Toutefois, quelques études ont fourni les résultats quantitatifs et qualitatifs présentés ci-dessous.

2.2.1. Etude quantitative.

Sich et Van Rijn (1992) ont étudié la flore bactérienne hétérotrophe qui se développe dans un circuit fermé d'un élevage mixte de Tilapia et de Carpes, d'environ $10 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ de poissons. Le système de traitement des eaux comprend un filtre biologique nitrifiant émergé, un filtre biologique dénitrifiant, et un bassin de décantation (pas de filtre mécanique). Ils observent que la flore bactérienne n'est pas répartie quantitativement de façon homogène dans tout le circuit (tableau n°1.2.) et qu'elle varie peu à l'échelle d'une journée.

Tableau n°1.2. Répartition de la flore bactérienne d'un circuit piscicole (Sich et Van Rijn, 1992).

Localisation	Unités Formant Colonies par ml (UFC·ml ⁻¹)
Eau de surface des bassins	10^8
Entrée bassin	10^6
Boues du fond du bassin	10^9
Filtre dénitrifiant	10^{10}

Dans le but de quantifier l'activité bactérienne, Sich et Van Rijn (1992) ont recherché le pourcentage de cellules en division (FDC) et le pourcentage de cellules présentant une activité respiratoire (INT-active). Il s'avère que le pourcentage de FDC reste toujours très bas et que le pourcentage de cellules ayant une activité respiratoire est le même pour tous les sites : il varie entre 10 et 20 % du nombre total de bactéries. Une relativement grande proportion de cellules INT-actives se trouve à la sortie du bassin, alors que cette proportion est faible à la surface du bassin.

Le nombre de bactéries hétérotrophes autour de cages d'élevage de truites varie entre 2 et $5 \cdot 10^5$ UFC·ml⁻¹ (Korzeniewski et Korzeniewska, 1982). Une étude de la flore hétérotrophe d'un élevage de crevettes en système clos (Sohier et Bianchi, 1986) montre que, quelle que soit la charge initiale des bassins, les bactéries évoluent quantitativement de façon comparable. On observe une diminution des populations hétérotrophes dans les premiers jours d'élevage, puis une augmentation jusqu'à un niveau supérieur au niveau initial. Ces résultats sont inversés si on réalise un comptage direct par épifluorescence, mettant en évidence l'aspect qualitatif du phénomène. Pendant les premiers jours d'élevage, le milieu sélectionne une flore plus adaptée (chapitre 1., § 2.2.). Ces résultats peuvent être inversés dans le cas de systèmes clos marins ayant été préalablement enrichis en azote organique ou minéral (Bianchi et Van Wambeke, 1982). Il est utile de signaler que les élevages en circuit fermé de crevettes sont des systèmes très spécifiques : ils contiennent quelques kg de biomasse par m³ et une eau particulièrement chargée en matières en suspension (MES). Ces MES servent de support aux bactéries du système, réalisant ainsi dans le bassin, le processus de nitrification.

Des études concernant les phases larvaire, l'alevinage et l'élevage des géniteurs de Bar ont été réalisées sur des circuits piscicoles recirculés constitués d'un bassin d'élevage, d'une filtration mécanique et d'un filtre biologique nitrifiant (Blancheton et Canaguier, 1995):

- il semble que le filtre biologique, au moins au niveau quantitatif, soit l'élément prédominant vis-à-vis de la production de bactéries dans le circuit, sauf lorsque la nourriture est une source particulièrement importante de bactéries, ce qui est le cas avec la nourriture vivante (artemia, rotifères) ;
- il n'y a pas de corrélation entre les MES du bassin et la concentration bactérienne du même bassin.

2.2.2. Etude qualitative.

Une étude sur la microflore d'un bassin d'élevage contenant des carpes (Paat et al., 1989) met en évidence 8 groupes de bactéries différents : les genres *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, les familles *Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Chromobacterium* et les bactéries corynéformes. En début d'expérimentation, les genres *Pseudomonas*, *Flavobacterium* et *Moraxella* sont majoritaires, alors que neuf jours plus tard *Pseudomonas*, *Flavobacterium* sont toujours présents mais la famille des *Vibrionaceae* a remplacé le genre *Moraxella*. Ceci suggère une pression de sélection s'exerçant sur les populations bactériennes du bassin.

Sugita et al., (1992), dans une étude plus spécifique portant sur les bactéries microaérophiles de l'eau et des sédiments d'un bassin d'eau stagnante contenant des carpes, montrent qu'il existe des fluctuations annuelles dans les bassins soumis aux variations climatiques : pour les microaérophiles, diminution au printemps et au début de l'automne; pour les aérobies/anaérobies facultatives (A/AF), augmentation à la fin du printemps et à l'automne; et pour les anaérobies strictes, pas de fluctuation significative. Les microaérophiles sont représentés jusqu'à 3% des bactéries, alors que les bactéries A/AF 94 % et les anaérobies strictes environ 3 %. Les bactéries microaérophiles isolées appartiennent à 13 groupes définis en fonction des critères suivants: Gram, forme de la cellule, existence d'une forme sporulée, catalase, oxydase, pigmentation des colonies et formation d'acide à partir du glucose. L'un de ces groupes pourrait être le genre *Campylobacter*, défini comme pathogène pour l'homme et les animaux par le Bergey's Manuel.

D'autres travaux (Sohier et Bianchi, 1986) montrent qu'il existe une véritable évolution de la flore hétérotrophe en réponse à l'introduction de crevettes (*Penaeus japonicus*) dans un circuit fermé. La population bactérienne augmente au cours de la phase d'accumulation d'azote inorganique. Elle est alors constituée à plus de 40 % par la flore liée aux flux de nourriture et à l'activité animale. Cette flore représente 60 à 70 % des souches après 7 mois d'élevage. Les autres 30 % comprennent une population ayant les caractéristiques d'une population issue du milieu naturel et regroupant des types bactériens très variés. On peut remarquer la présence, entre le 4^{ème} et le 5^{ème} jour de l'expérience, de nombreux germes vibrioïdes et chitinolytiques. Ces germes disparaissent ensuite car, à ce moment là, le milieu exerce une pression de sélection envers les germes ayant des indices synthétiques élevés : seuls les germes auxotrophes et peu versatiles peuvent subsister dans le milieu d'élevage.

Enfin, les travaux de Bianchi et *al.*, (1992) ont montré qu'aux deux types de flores autotrophes correspondait une flore hétérotrophe associée spécifique : la culture d'enrichissement des bactéries NH_4^+ -oxydantes conduit à une forte sélection des bactéries présentes dans l'eau d'élevage, se traduisant par une disparition des entérobactéries associées aux animaux. Deux principaux groupes taxinomiques sont associés aux bactéries NH_4^+ -oxydantes : des *Pseudomonas* et des bactéries en forme de bâtonnet, Gram positif et asporulées. Cette flore est caractérisée par son incapacité à utiliser les acides aminés comme source d'énergie et de carbone. Au contraire, les bactéries associées aux NO_2^- -oxydantes sont capables d'utiliser un grand nombre de composés organiques comme source de carbone et d'énergie. La plupart de ces bactéries sont des bâtonnets asporulés Gram positif, associés à quelques *Pseudomonas*.

Parmi les populations hétérotrophes certaines peuvent avoir une activité dénitrifiante, car elles sont capables, en condition d'anaérobiose, de réduire les nitrites et les nitrates en azote gazeux. Ce sont les bactéries dites dénitrifiantes : elles se trouvent dans pratiquement toutes les eaux (Rheinheimer, 1980). Elles sont aérobie-anaérobie facultatives et possèdent un métabolisme dissimilatif qui leur permet, dans des conditions d'anaérobiose, d'utiliser les nitrites et les nitrates comme accepteur final d'électrons.

Les principales souches dénitrifiantes rencontrées en pisciculture sont les suivantes :

- genres *Pseudomonas* et *Vibrio* (Stewart et *al.*, 1977) ;
- genres *Alcaligenes denitrificans*, *Bacillus* et *Micrococcus* (Alexander, 1978) ;
- genres *Pseudomonas*, *Moraxella/Acinetobacter*, *Flavobacterium/Cytophaga*, *Aeromonas* et famille des *Enterobacteriaceae* (Horsley, 1979).

2.3. Le contrôle des populations bactériennes en milieu aquatique.

La lutte contre les pathologies bactériennes en aquaculture oblige à un contrôle de la qualité bactériologique des eaux d'élevage. Ce contrôle s'effectue sur l'eau d'entrée et/ou sur l'eau d'élevage pour les systèmes "recirculés". C'est sur les piscicultures en eau douce (car développées en premier) qu'on a été mis au point les premiers systèmes de contrôle des populations bactériennes basés sur l'utilisation de l'effet stérilisant des rayons Ultra Violet (UV), du chlore, de l'ozone ou du couplage ozone -UV. Les techniques basées sur les UV ont pu être directement appliquées à l'eau de mer, alors que celles utilisant l'ozone ont dû être adaptées en raison de la réactivité de l'ozone avec les ions halogénures. Nous passerons

également en revue les autres mécanismes naturels qui régulent les concentrations en bactéries, en diminuant leur taux de croissance ou en augmentant leur mortalité.

Le contrôle des populations bactériennes ne vise que les bactéries hétérotrophes puisqu'elles comprennent les bactéries pathogènes des poissons, qu'elles sont consommatrices d'oxygène et qu'elles peuvent, dans certains cas, être en compétition avec les bactéries autotrophes nitrifiantes. Ce contrôle est mis en place, en premier lieu, dans les piscicultures en eau douce, en utilisant le rayonnement UV et l'ozone. Au fur et à mesure du développement de l'aquaculture marine, l'utilisation de l'UV s'est davantage répandue en raison des difficultés de mise en œuvre de l'ozone en eau de mer (Blancheton, 2000).

Le contrôle des populations bactériennes par les UV et par l'ozone est traité dans le chapitre 1. § 1.3.. Les autres moyens de contrôle sont les suivants:

- les lavages ("Back-wash") du filtre biologique sont utilisés, de façon plus ou moins fréquente, pour éliminer mécaniquement (par passage dans le filtre, d'un courant d'eau et d'air en sens inverse de l'écoulement normal) la zooglyée des filtres mécaniques;

- le chlore, sous forme de gaz ou de diverses combinaisons chimiques, est un des antiseptiques les plus communs. Tous les composés chlorés agissent de façon rigoureusement semblable, en formant de l'acide hypochloreux ClOH. L'oxygène naissant libéré au cours de cette réaction a un pouvoir oxydant élevé. La plupart des microorganismes sont tués instantanément à son contact (Meyer et *al.*, 1984);

- le broutage est aussi un phénomène important dans tous les écosystèmes aquatiques (Billen et *al.*, 1988). C'est aussi un des facteurs de contrôle du développement des biofilms bactériens (Pedersen, 1982). Le broutage peut être dû aux protozoaires (Sherr et *al.*, 1986) et/ou aux nématodes (Traunspurger et *al.*, 1997). La quantification de ce phénomène est présentée dans la partie modélisation (chapitre 1., §5.4.2);

- la mortalité naturelle est définie comme le processus de perte de l'intégrité fonctionnelle et morphologique de la bactérie, aboutissant à sa lyse et à la destruction de son matériel génétique (Servais et *al.*, 1989). Le taux de mortalité est constant quelle que soit la phase de développement (Servais et *al.*, 1987) et dépend de la température (Billen et *al.*, 1988). La quantification de ce phénomène est présentée dans la partie modélisation.

- la température a un effet positif sur le taux de croissance. Cependant quand la température optimum est dépassée, elle a une action sur les formes végétatives des bactéries qui sont en général inactivées par un chauffage de 50 à 60°C durant 30 minutes (Meyer et *al.*, 1984).

Lund et Hondve (1994) ont décrit des taux de mortalité immédiate pouvant atteindre jusqu'à 60 % des bactéries dans des eaux irradiées aux UV (dose d'irradiation: $96 \text{ mWs}\cdot\text{cm}^{-2}$) contenant des substances humiques et des bactéries ($7\cdot 10^4 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$). Cette partie est traitée dans le chapitre consacré aux substances humiques (chapitre 1. § 1.2.3.).

Les autres substances ayant des actions antibactériennes, comme les antibiotiques couramment utilisés en aquaculture, ne seront pas traitées dans le cadre de notre étude.

3. UTILISATION DES UV ET DE L'OZONE EN PISCICULTURE.

3.1. Le rayonnement UV.

Le rayonnement Ultra Violet (UV) correspond au rayonnement du spectre électromagnétique dont les longueurs sont comprises entre 10 et 400 nm. Il est donc placé entre les rayons X et la lumière visible. Le spectre UV est lui même divisé en quatre parties: le "vacuum UV " entre 10 et 200 nm, les UV-C entre 200 et 280 nm, les UV-B entre 280 et 315 nm et enfin les UV-A entre 315 et 400 nm. Le rayonnement UV régnant dans le vide et les UV-C sont absorbés par l'ozone. L'énergie du rayonnement étant inversement proportionnelle à la longueur d'onde, la figure n°1.2., ci dessous donne la correspondance entre la longueur d'onde et l'énergie fournie par un quantum.

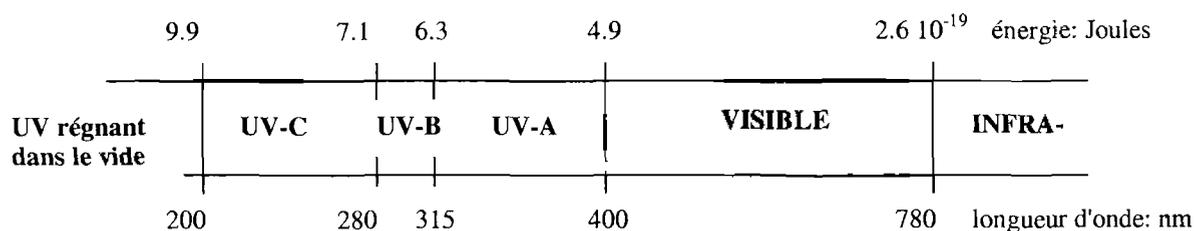


Figure n°1.2. Spectre des radiations magnétiques et correspondance entre longueur d'onde et énergie.

Pour induire une réaction chimique par un rayon UV, il est nécessaire que l'énergie puisse être absorbée par les molécules chimiques. La région la plus active du spectre d'émission est située entre 260 et 270 nm (Meyer et *al.*, 1984). Les graphiques ci-dessous présentent les spectres d'absorption spécifiques des différentes bases azotées (fig. n°1.3.) et de l'ADN (fig. n°1.4.).

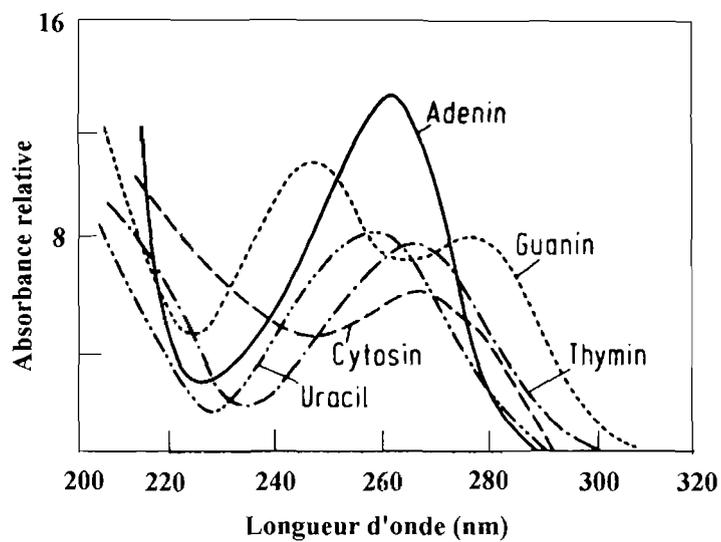


Figure n°1.3. Spectre d'absorption des différentes bases azotées, (Angehrn, 1984).

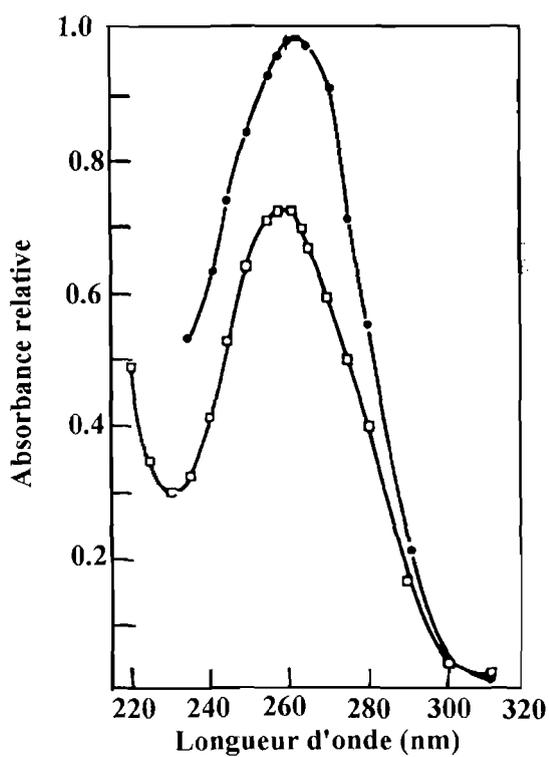


Figure n°1.4. Spectre d'absorption de l'ADN bi (o) et mono caténaire (•). (Angehrn, 1984).

Le rayonnement UV agit sur l'ADN des microorganismes et des virus (Ellner, 1995), principalement au niveau de la thymine (fig. n°1.5.) : c'est une réaction réversible. Les effets sont décrits dans la figure n°1.4.. Les différents organismes nécessitent, pour être inactivés, des doses d'UV différentes (Tableau n°1.3.) : les doses d'UV sont exprimées en $W \cdot s \cdot cm^{-2}$. Généralement, pour un abattement de 90 % ces valeurs sont à diviser par 2 (Angehrn, 1984).

Tableau n°1.3. Doses d'UV pour inactivation complète de différents types de bactéries et de virus (Ellner, 1995).

Organismes	DoseS d'inactivation totale par l'UV ($\mu W \cdot s \cdot cm^{-2}$)
<i>Shigella</i>	3400 à 7000
<i>E. coli</i>	6600
<i>Salmonella</i>	6000 à 15200
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	6500
<i>Legionella</i>	2900 à 5500
<i>Leptospira interrogans</i>	6000
virus hépatique	8000

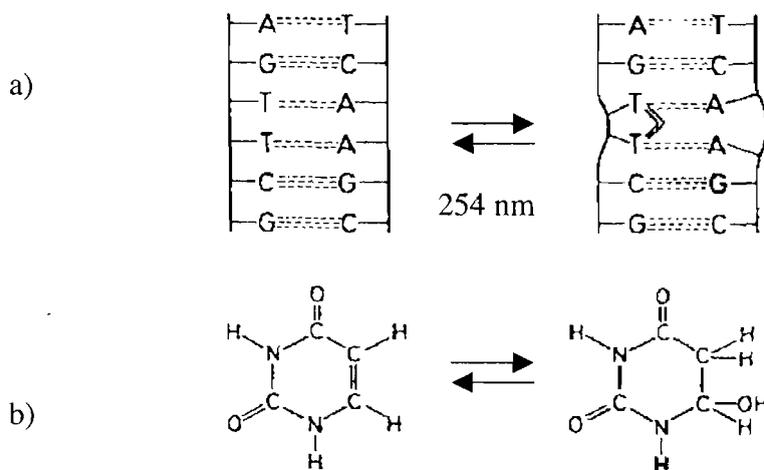


Figure n°1.5. Action de l'UV sur l'ADN (Angehrn, 1984).

a) mode d'action de l'UV sur l'ADN

b) action de l'UV au niveau de la Thymine

3.2. L'ozone.

L'ozone est une molécule constituée de trois atomes d'oxygène, qui se forme par oxydation de l'oxygène O_2 . Il peut être généré de multiples façons (Nebel, 1981) :

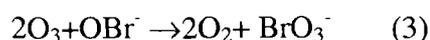
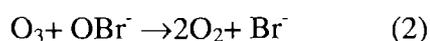
- la thermolyse de l'oxygène à 2760 °C suivie d'une trempe dans l'oxygène liquide,

- l'oxydation lente du phosphore,
- l'irradiation de l'oxygène par des rayons β ,
- l'électrolyse de solutions aqueuses de phosphates,
- l'électrolyse d'acide sulfurique concentré à basse température,
- l'irradiation d'oxygène ou d'air par les rayons ultraviolets,
- la décharge électrique dans un flux d'air ou d'oxygène.

3.2.1. La réactivité de l'ozone.

L'ozone a un potentiel Red-Ox de + 2,07 V qui lui permet d'oxyder les ions bromures et les chlorures. Les concentrations de ces composés sont de l'ordre de 0,065 et 18,97 g par litre respectivement, pour une eau de mer à 34 ‰ (Sverdrup *et al.*, 1963).

Les réactions sont les suivantes:



Le tableau n°1.4. donne les valeurs des constantes de réaction pour les bromures et les chlorures.

Tableau n°1.4. Constantes de réaction ozone-halogénures.

Constantes de réaction à 20°C (mole·litre ⁻¹ ·s ⁻¹)	Bromure (0,0018 M)	Chlorure (1,09 M)
k1	160	0,003
k2	330	110
k3	100	30

Compte tenu des concentrations en bromures et en chlorures dans les eaux de mer (respectivement 0,0018 et 1,09 mol·l⁻¹) et des constantes de réaction de la réaction (1), l'ozone agit préférentiellement sur les bromures, même en eau de mer où la concentration en Cl⁻ est plus de 300 fois supérieure. Compte tenu des constantes des réactions (1) (2), l'ion hypobromite est instable, sa durée de demi-vie peut varier entre moins d'une heure et plus de 12 heures en fonction des conditions de lumière et de salinité (Richardson *et al.*, 1981). Le

bromate (BrO_3^-) est le produit final de la réaction de l'ozone sur les halogénures, c'est un composé stable. Comme sa vitesse de formation k_3 est trois fois inférieure à k_2 , il ne s'accumule que dans des eaux ozonées riches en hypobromite. D'après Grguric et *al.*, 1994 les ions de types hypohalites (BrO^- et ClO^-) peuvent avoir des effets sur l'osmorégulation et la respiration des poissons.

Le pH joue un rôle important sur la formation d'hypobromite et de bromate car l'ion BrO^- est la base du couple BrOH/BrO^- (dont le pK_a est égal à 8,69) et la réaction avec l'ozone se fait préférentiellement avec le BrO^- (Hoigné et *al.*, 1985). Au pH de l'eau de mer (environ 8), la forme acide BrOH est la forme principale (80%) et les réactions de destruction d'hypobromite (réaction (2)) et de formation des bromates (réaction (3)) sont donc limitées. Ainsi, en milieu acide la quantité d'hypobromite formée est plus importante qu'en milieu basique.

En eau de mer, les concentrations en chlorure induisent des effets sur l'ozonation, puisque la concentration en hypohalites d'un mélange de chlorures et de bromures est plus faible que la somme des concentrations obtenues dans deux solutions différentes (Grguric et *al.*, 1994). De plus, la production de bromates est augmentée de façon significative par addition de chlorures. Ceci serait dû à l'oxydation des Br^- par des ClOH , la constante de réaction étant $k_4 = 6,77 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Compte tenu de la réaction (1), ceci donne une nouvelle réaction d'oxydation des bromures par l'ozone, catalysée par les chlorures (voir équation 5). La vitesse de la réaction k_4 étant plus rapide d'un facteur 10^2 par rapport à la réaction de l'hypochlorite avec l'ozone pour former des chlorates (réaction 3, $k_3 = 30$), l'hypochlorite est utilisé préférentiellement pour catalyser l'oxydation des bromures.



En eau de mer, les ions chlorures réagissent comme un catalyseur de la réaction de formation des ions hypobromites et la production des bromates sera donc augmentée, alors que la concentration en hypohalites sera diminuée. On appelle oxydants totaux résiduels (OTR) la totalité des oxydants formés par action de l'ozone sur l'eau de mer.

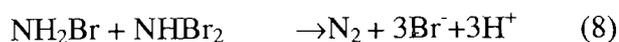
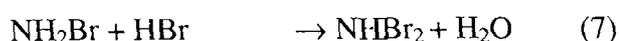
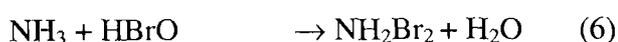
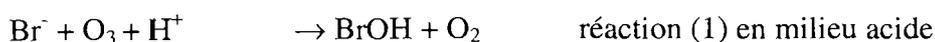
3.2.2. Les modes d'action de l'ozone.

L'eau douce contient peu d'halogénures, donc peu d'OTR après traitement à l'ozone qui reste alors aussi présent sous la forme moléculaire. C'est donc un mélange O_3 /OTR qui agit sur la matière organique. En ce qui concerne le mode d'action de l'ozone sur les micro-organismes, les avis sont partagés entre les partisans de l'action de l'ozone moléculaire (Hoigne and Bader, 1978; Finch et al., 1992; Labatiuk et al., 1994 dans Hunt et Marinas, 1997) et les partisans d'une action indirecte via les OTR (Dahi, 1976; Bancroft et al., 1984 dans Hunt Marinas, 1997). Hunt et Marinas (1997) montrent qu'en eau douce, à des pH compris entre 6 et 8, avec un traitement de 0,006 à 0,041 $mg \cdot l^{-1}$ d'ozone pendant une durée comprise entre 1,8 et 33 secondes, c'est l'ozone moléculaire qui est responsable de l'effet bactéricide (l'inactivation d'une souche d'*E. coli*).

En eau de mer, il n'y a pas ou peu d'ozone résiduel car l'ozone réagit avec les halogénures et certains composés organiques présents dans l'eau pour former des hypohalites, des peroxydes... Ces réactions étant instantanées, on ne sait pas aujourd'hui mesurer directement l'ozone dissous dans l'eau de mer : on réalise un dosage d'OTR exprimé en $mg \cdot l^{-1}$ de O_3 ou de Cl_2 (la notation en $mg \cdot l^{-1}$ de O_3 étant ambiguë puisqu'elle laisse entendre que l'on mesure l'ozone alors qu'on ne mesure que des OTR). En eau de mer, l'ozone peut réagir instantanément, ensuite seuls les OTR agissent. La part entre ces deux modes d'action n'est pas définie. Les différents auteurs semblent s'accorder sur le fait que l'ozone et ses sous produits agissent en lysant la paroi cellulaire puis la membrane plasmique des microorganismes (Crisp et Bland, 1990).

Effet de l'ozone sur l'ammoniaque.

En eau de mer, Kobayashi et al., (1993) décrivent l'élimination de l'ammoniaque sans formation de nitrates (moins de 1 % de la concentration initiale en ammoniaque), avec une consommation de 5 g d'ozone par g d'ammoniaque transformée. Ils montrent qu'il est possible de transformer de l'ammoniaque en azote gazeux sans passer par les deux étapes classiques que sont la nitrification puis la dénitrification. La voie réactionnelle est la suivante:



La réaction à partir des chlorures est aussi possible, mais elle est limitée par la vitesse de formation des chlorites (réaction 1). Par la suite, Yang et *al.*, (1999) ont montré que le rendement transformation de l'ammoniaque dépend du pH, du rapport Br⁻/N (qui permet d'éviter la formation de nitrates) et de la concentration en ammoniaque en entrée du réacteur. Le taux d'élimination de l'ammoniaque peut atteindre de l'ordre de 4 kg·m⁻³·jour⁻¹, pour une consommation en ozone de 5,4 g·g⁻¹ d'ammoniaque éliminée et une concentration en ammoniaque de 600 mg de N-NH₄·l⁻¹ en entrée de réacteur. En comparaison, le taux de nitrification dans un réacteur biologique (fonctionnant avec des bactéries nitrifiantes) est de l'ordre de 0,3 kg·m⁻³·jour⁻¹ (Iwai, 1983). Dans les filtres biologiques installés dans les systèmes d'élevage piscicole, il est de 0,2 kg·m⁻³·jour⁻¹ pour un garnissage ayant une porosité de 60 % (Covès et Gasset, 1996).

L'ozone est aussi utilisé pour améliorer l'efficacité des séparateurs de particules basé sur la floculation : il provoque une augmentation significative de la taille des particules (Rueter et Johnson, 1995). Cette application a été développée en élevage larvaire piscicole en eau douce par Cryer (1993).

Effet sur la décoloration des eaux.

L'ozone est aussi utilisé pour ses propriétés décolorantes : il oxyde la matière organique en molécules plus petites et jusqu'au CO₂ si la réaction est complète. Otte et *al.*, (1977) l'ont utilisé en eau douce pour décolorer leur eau d'élevage.

3.2.3. Les doses d'ozone appliquées (eau douce et eau de mer).

Le tableau n°1.5. ci dessous donne quelques doses de traitement à l'ozone pour différents types d'utilisation en eau de mer et en eau douce. Les premières applications ont été réalisées en traitement des eaux usées, en épuration des coquillages, en pisciculture eau douce (Salmoniculture) puis en pisciculture marine.

Tableau n°1.5. Les doses d'ozone et leurs applications.

Doses (mg·l ⁻¹ O ₃)	Temps de contact	Effets	Types de circuits	Références bibliographiques
0,111 0,063 0,064	1 minute	99% d'inactivation sur: <i>E. seriolicida</i> <i>P. piscicida</i> <i>V. anguillarum</i>	système batch eau de mer	Sugita et <i>al.</i> (1992)
Concentration finale : 0,8 à 1	3 à 9 minutes	100% d'inactivation de spores	system batch eau de mer	Crisp et Bland (1990)
1,5 ozone injectée	10 minutes	épuration coliformes	palourdes moules	Fauvel (1962)
3,5		épuration coliforme	eau d'entrée pisciculture eau douce	Rosenlund (1975)
6 à 20 d'O ₃ injecté	2 minutes	abattement flore totale	Carangue (<i>Caranx delicatissimus</i>) eau de mer	Kobayashi et <i>al.</i> , (1993)

3.2.4. La tolérance à l'ozone.

Le tableau n°1.6. donne quelques exemples de concentration maximale en oxydants résiduels totaux (OTR) et les animaux auxquels elles s'appliquent.

Tableau n°1.6. Concentrations maximales en ozone ou OTR.

Dose (OTR mg·l ⁻¹ de O ₃)	Temps de contact (heures)	Type animaux	Références
2,5	3		Reid et Arnold (1994)
1	24	Crevette	
0,1	24	Ombrine	Reid et Arnold (1994)
0,01 à 0,06	4	Truite Arc en ciel	Rosenlund (1975)

Remarque: Pour passer en mg·l⁻¹ de Cl₂, il faut diviser par 0,677.

3.2.5. L'élimination de l'ozone et des OTR.

Afin de diminuer la quantité d'ozone résiduel et d'OTR, différentes techniques peuvent être utilisées : (1) l'ozone étant un gaz, on peut l'éliminer par bullage d'air ; (2) l'ozone peut être éliminé par rayonnement UV (Liltved, 1995), (3) les OTR étant stables, pour les éliminer il faut les faire réagir avec des composés chimiques réducteurs (Liltved, 1995) (2) on peut aussi utiliser le charbon actif pour fixer les OTR (Liltved, 1995 ; Kobayashi et *al.*, 1993; Ozawa et *al.*, 1991)

La compréhension de la relation entre les bactéries hétérotrophes et la concentration en carbone organique qui s'accumule dans les circuits fermés d'élevage piscicole nécessite l'élaboration d'un modèle sur la dynamique des populations bactériennes hétérotrophes. Cette étude bibliographique a trois objectifs : le premier est de définir ce qu'est un biofilm bactérien, et quels sont les phases, les mécanismes de sa mise en place et les paramètres qui influencent son état stationnaire ; Le second est de définir le type de modèle le plus approprié à nos systèmes et les différentes étapes qui mènent à sa réalisation et à son évaluation ; Le troisième est de présenter les paramètres pris en compte et leurs différentes évaluations.

4. LA CROISSANCE DU BAR.

La croissance se définit comme l'accroissement ordonné de tous les composants d'un organisme. Le bar (*Dicentrarchus labrax*) appartient au super-ordre de téléostéens dont la croissance peut être affectée par la variation des facteurs environnementaux tels que la température ou la concentration en oxygène du milieu (Hepher, 1988). Différents types de modèles ont été développés pour décrire la croissance de ces poissons. Les modèles basés sur des bilans énergétiques prennent en compte l'évolution de nombreuses variables telles que la température de l'eau, la concentration en oxygène et la qualité de l'alimentation (From et Rasmussen, 1984; Cuesco et al., 1985; Muller Feuga, 1990). Ces types de modèles sont parfaitement adaptés aux élevages en cage et aux élevages en circuit ouvert qui sont très fortement dépendants des conditions du milieu. Cependant, depuis les années 1990, de nombreux auteurs ont établi des modèles empiriques, souvent à partir de régressions logarithmiques : Forsberg (1996) sur le saumon d'atlantique, Alanârâ (1998) sur la truite arc-en-ciel et Tanguy et Le Grel (1989) sur le bar.

Le modèle présenté par Tanguy et Le Grel (1989) est développé en prenant en compte la notion de poids pour simuler la croissance du bar en cage (phase de grossissement). Ils estiment le taux de croissance journalier (TCJ) par l'expression suivante :

$$TCJ = \alpha \cdot e^{12 \cdot T} \cdot Pds^{-0,34}$$

Avec : TCJ le gain de poids exprimé en % par jour

T la température de l'eau d'élevage

$\alpha = 0,3$ si T est inférieure à 26°C

$\alpha = 0,2$ si T est supérieure à 26°C

Pds le poids du poissons

Le poids au jour (i) s'exprime alors en fonction du poids du jour précédent par :

$$Pds(i) = Pds(i-1) \cdot (1 + TCJ/100)$$

Ce modèle est établi à partir d'élevages réalisés en cage, pour lesquels les conditions climatiques sont très fluctuantes ce qui implique de fortes variations du TCJ. De plus, les densités ne dépassent jamais $25 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ de poissons, alors que les biomasses en circuit recirculé sont souvent comprises entre 25 et $100 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Le modèle n'est donc pas parfaitement adapté aux élevages en système recirculé dans lesquels les paramètres du milieu (pH, oxygène, composés chimiques...) sont contrôlés en permanence.

Contrairement aux tests de toxicité aiguë, la toxicité chronique traite des effets à plus long terme de concentrations "sublétales", c'est à dire n'engendrant pas de mortalité immédiate au niveau d'une population. Les tests biologiques globaux sont les plus utilisés. Ils sont impérativement réalisés en milieu renouvelé, la principale difficulté étant de maintenir les conditions expérimentales constantes sur de longues périodes (un à plusieurs mois). Ils sont aussi basés sur la bonne interprétation des réponses des animaux au produit testé, ce qui impose de les placer dans un environnement totalement contrôlé où la croissance est optimale en l'absence de polluant. Les tests biologiques permettent d'évaluer les diverses modifications (perturbations du comportement, de la croissance, de la reproduction, du développement larvaire, ou celles d'une fonction physiologique définie ou d'une enzyme donnée) provoquées par l'exposition au produit étudié, afin d'estimer les risques encourus dans des conditions de concentrations et de durées d'exposition précises. Les CL50 (concentration létale pour 50% des individus) chroniques sont déterminées ainsi que les "seuils de risque" (LOEC: concentration la plus faible ayant un effet), et les seuils de "sécurité" (NOEC: concentration la plus forte n'ayant pas d'effet). Ces différents seuils varient selon le critère retenu (croissance, appétit, efficacité alimentaire) et n'ont qu'une valeur indicative, même lorsque la durée recommandée de un mois, est respectée (Person-Le-Ruyet et Bœuf, 1998).

De très nombreux facteurs peuvent avoir un effet sur les performances des poissons. La liste de ces facteurs n'est jamais close. Pour le bar (*Dicentrarchus labrax*) le pH optimum se situe entre 6,1 et 7,9 (Lemarié et al., 2000), sa croissance est ralentie dès $0,23 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de N-NH_3 (Pearson-Le Ruyet et Boeuf, 1998)...

5. MODELISATION DU COMPARTIMENT BACTERIEN.

5.1. La croissance bactérienne.

Chez les micro-organismes unicellulaires (bactéries, levures), la croissance aboutit à une augmentation du nombre d'individus par multiplication, puisqu'une bactérie donne

naissance à deux bactéries. Parallèlement, cette croissance se traduit par un appauvrissement du milieu en substrats catabolisables et par un enrichissement en divers métabolites. L'accroissement de la population peut s'exprimer par (Meyer et Deiana, 1984) :

$$\partial N = N \cdot \mu \cdot \partial t \text{ et ainsi } \mu = 1/N \partial N / \partial t$$

Avec N la concentration cellulaire

t le temps

μ la vitesse spécifique de croissance elle dépend du germe et des conditions de culture

En intégrant cette équation entre $t - t_0$, et $N - N_0$, on obtient une expression du nombre de cellules en fonction de temps:

$$N = N_0 e^{\mu t} \text{ ce qui est équivalent à } \mu = \ln(N/N_0)/t$$

Le taux de croissance est fonction de la température et de la quantité de substrat disponible dans le milieu. Son expression sera détaillée dans le paragraphe consacré à l'estimation des rendements bactériens (chapitre 1., § 5.4.3.).

5.2. Les biofilms bactériens.

Les bactéries peuvent s'accumuler sur des surfaces de matériaux très divers. Trois mécanismes se succèdent dans l'adhésion des bactéries sur les surfaces : l'adsorption, la fixation et la colonisation (Costerton et *al.*, 1987).

L'adsorption est une phase réversible et courte pendant laquelle les bactéries entrent en contact avec le support. Les forces mises en œuvre sont de nature physique : Van der Waals et liaisons hydrogène pour les forces attractives, électrostatiques pour les forces répulsives. En effet, les bactéries sont chargées négativement : pour les bactéries Gram – (qui nous concernent plus particulièrement), la charge est portée par les lipopolysaccharides (LPS) et les protéines de la membrane externe, ainsi que par les polymères extracellulaires du glycocalyx (Fig. n°1.6.). Pour les bactéries Gram +, la charge est portée par les acides teichoïques et teichuroniques, les polysaccharides et les polypeptides du glycocalyx (Doumergue, 1996).

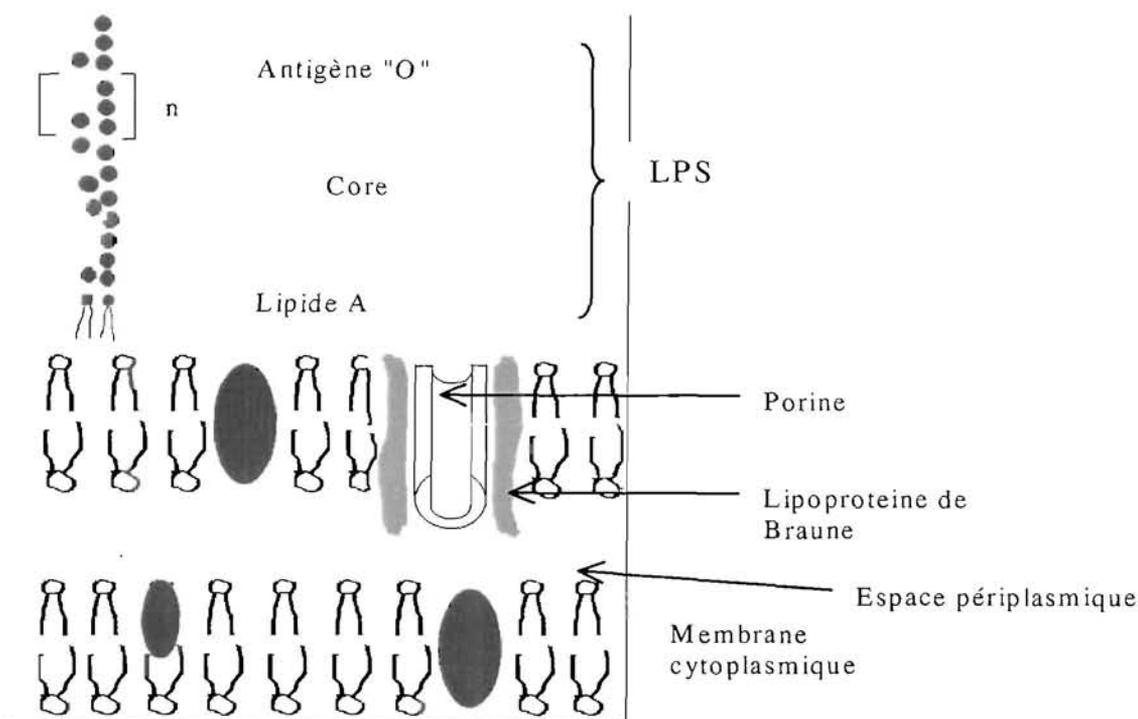


Figure n°1.6. Structure de la paroi des bactéries Gram négatif (Meyer *et al.*, 1984). Le LPS est représenté sous forme agrandie.

La distance bactéries - support doit être faible, de l'ordre de 5 à 10 nm (Isoard, 1988), et toute diminution du potentiel de surface favorise le processus d'adhésion (Etesse *et al.*, 1988). Dans les systèmes dynamiques (ce qui est notre cas) le transport des bactéries vers la surface est assuré par les forces dynamiques des fluides, et l'adhésion varie en fonction de la concentration en germes dans le fluide et de la vitesse de passage du fluide (Bott *et al.*, 1983 ; Rutter et Leech, 1980). Dans les systèmes statiques, les micro-organismes dépourvus de flagelles forment des agrégats qui flocculent et sédimentent jusqu'à la surface du support (Marshall *et al.*, 1985). D'après Ellwood *et al.* (1974), le taux de croissance joue un rôle sur la phase d'adhésion.

Les bactéries peuvent être assimilées, pendant la phase d'adsorption, à de petites particules dont le dépôt sur les parois d'un tube est décrit par Bowen et Epstein (1979) qui définissent un taux de dépôt local par :

$$J_D = DC_o / b \left[(2/9\gamma)^{1/3} \right] / \left[\Gamma(4/3) + 1/K (2\gamma/9)^{1/3} \right]$$

- Avec :
- γ : $(2Dx)/(3V_m b^2)$,
 - V_m : vitesse du fluide dans le tube,
 - b : rayon du tuyau,
 - x : distance parcourue dans le tuyau,
 - D : coefficient de Stokes-Epstein = $KT/(6\pi\eta a)$,

k : constante de Boltzmann,
 η : viscosité du milieu aqueux,
 a : rayon moyen des particules,
 T : température,
 C_0 : concentration des particules en entrée du tuyau,
 $\Gamma(4/3)$: constante,
 K : constante de réaction de la surface.

K est évalué en considérant les forces électrostatiques et les forces de Van der Waals; elle tend vers $+\infty$ quand il n'y a aucune interaction entre particule et surface et elle est indépendante de la vitesse de passage du fluide.

La seconde phase est la phase de fixation. Elle consiste en l'établissement de contacts entre la bactérie et la surface, par production d'exopolysaccharides bactériens qui réalisent des liaisons permanentes avec le support (Isoard, 1988). La production de glycocalyx est l'essentiel de cette étape : elle entraîne la formation d'une matrice fibreuse, dans laquelle les corps bactériens sont immobilisés et résistent aux forces de cisaillement.

La colonisation suit la fixation et la prolifération bactérienne peut alors commencer. Elle aboutit à une structure complexe, le consortium. Cette phase comporte deux étapes qui sont la formation de colonies puis la formation du consortium. Cette dernière se fait en deux phases : tout d'abord l'apparition de structures communautaires près des sources alimentaires, qui sont ensuite recouvertes par des bactéries hétérotrophes capables de se développer sur leur propre exsudat (Costerton et *al.*, 1987).

A partir de la phase de colonisation, on peut parler véritablement d'un biofilm qui est caractérisé par son épaisseur. Characklis et *al.*, (1980) déterminent une épaisseur critique de biofilm à partir de laquelle les facteurs de friction augmentent trop pour permettre une plus grande épaisseur. Cette épaisseur critique δ est approximativement égale à la couche inférieure visqueuse ("the viscous sublayer"), zone proche de la paroi et dans laquelle la vitesse du fluide est inférieure à la vitesse moyenne du fluide circulant le long du biofilm. On définit le facteur f_F comme le facteur de friction, paramètre standard sans dimension, indicatif des résistances dues aux forces de friction rencontrées par un fluide traversant un tuyau. Sa valeur se calcule en appliquant la formule suivante :

$$f_F = 2D * \Delta P / (Lv^2 \rho)$$

Avec : ΔP : variation de pression entre l'entrée et la sortie du réacteur,
 L : longueur de tuyau,
 D : diamètre créé par le fluide,
 ρ : densité du fluide,
 v : vitesse.

L'épaisseur de la couche visqueuse δ est alors définie par :

$$\delta = (10D / Re) / \sqrt{f_F / 2}$$

Avec : D : diamètre du tuyau,
Re : nombre de Reynolds.

Mac Coy et *al.*, (1981) montrent que le développement des bactéries filamenteuses fermement attachées à la surface est à l'origine de l'augmentation de l'épaisseur du biofilm au dessus de son épaisseur critique. La mise en place de ces bactéries filamenteuses se fait d'autant plus vite que la vitesse de passage du fluide est faible. Dans leur cas de figure, elle se fait au bout de 20 heures pour les faibles vitesses ($138 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$) et de 60 heures pour les vitesses élevées ($365 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$) (fig. n°1.7.).

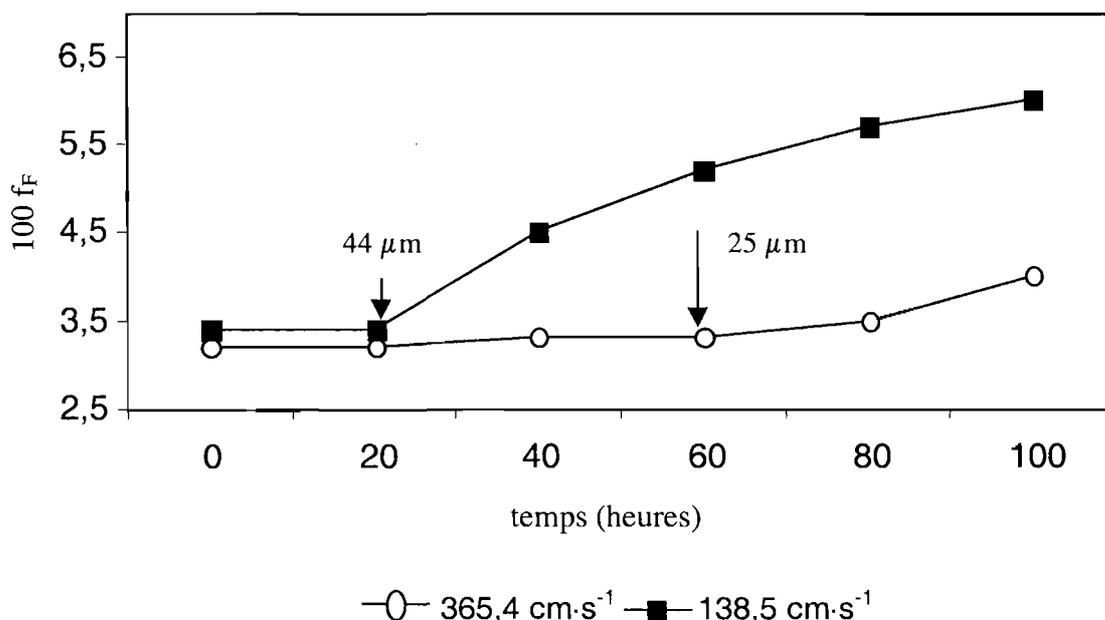


Figure n°1.7. Augmentation du facteur de friction (f_F) durant l'installation d'un biofilm à deux vitesses différentes (d'après Mc Coy et *al.*, 1981).

Bott et Miller (1983) ont travaillé sur les phénomènes qui influencent l'épaisseur d'un biofilm (sur paroi aluminium). Leurs expériences ont montré que :

- la présence d'apport nutritif augmente l'épaisseur du biofilm ;
- l'augmentation de l'épaisseur du biofilm est fonction de la vitesse de passage, jusqu'à une vitesse optimum (pour le biofilm) à partir de laquelle l'épaisseur du biofilm diminue puis se stabilise quelle que soit la vitesse. Il existe donc une vitesse optimum pour le biofilm ;

- pour deux vitesses testées (0,5 et 2 m·s⁻¹), en présence de nutriments, l'épaisseur du biofilm n'est pas modifiée si on n'apporte plus de bactéries libres dans le système. Cela montre que la fixation des bactéries sur un biofilm installé n'est pas un phénomène très important ;

- pour des vitesses de passage faibles (0,5 m·s⁻¹), l'arrêt d'apport de nutriments (tout en maintenant un apport de bactéries en entrée de réacteur) provoque une baisse de la taille du biofilm, ce qui met en évidence que les phénomènes de dépôt de bactéries sont moins importants que les phénomènes de croissance puis de relargage des bactéries dans le liquide circulant. A des vitesses de passage faibles, les apports nutritifs peuvent être limitants ;

- en revanche, pour des vitesses élevées (2 m·s⁻¹), l'arrêt de croissance bactérienne, avec le maintien d'apport de bactéries en entrée de réacteur, ne provoque pas de modification de la taille du biofilm : les flux de croissance et de dépôt de bactéries sont alors équivalents au flux de relargage.

Ces expériences mettent en évidence le rôle fondamental de deux phénomènes dans le maintien d'un biofilm : le taux de croissance (fonction de la quantité de nutriments disponibles) et le détachement des bactéries (fonction de l'hydrodynamique et du taux de croissance). A des vitesses de passage faible, les phénomènes de dépôt de bactéries sont moins importants que les phénomènes de croissance.

Par ailleurs, Gerald et *al.*, (1987) ont montré que le détachement des bactéries était plus corrélé au taux de croissance qu'au nombre total de bactéries attachées sur le biofilm, comme l'avait proposé Rytman (1982).

Il propose une relation du type :

$$S = b_s + b'_s \cdot \mu$$

avec μ le taux de croissance (jour⁻¹)

b_s le coefficient directement relié au nombre de bactéries

b'_s est de l'ordre de 0,3 jour⁻¹ soit 0,0125 h⁻¹, mais ce terme dépend de la nature du substrat (ici le phénol).

5.3. La modélisation du fonctionnement des biofilms bactériens dans les réseaux d'eau potable et de traitement des eaux.

5.3.1. Les deux types de modèles.

Il existe deux types de modèle possibles : les modèles déterministes et les modèles statistiques. Les modèles de type « déterministe », sont définis comme des modèles dans lesquels les paramètres sont connus de façon exacte, et non estimés en terme de distribution statistique (Jorgensen, 1986). Ce type de modèle exige une parfaite connaissance du comportement du système. Les écosystèmes sont représentés sous forme de phénomènes élémentaires que l'on relie pour en reconstituer une version simplifiée et que l'on peut retranscrire entièrement sous forme d'équations différentielles en fonction du temps. D'après Jolivet (1983), on peut dire qu'un phénomène est susceptible d'être représenté par un modèle à compartiments lorsqu'il s'agit de l'évolution au cours du temps d'un ou de plusieurs éléments se présentant successivement sous plusieurs formes, que cette forme soit une position de l'espace, un état physique ou les deux à la fois. D'une façon plus imagée, on peut représenter le phénomène par un ensemble de "boîtes", les compartiments, entre lesquels circulent de la matière, des individus ou de l'énergie, cette circulation étant matérialisée par des flèches.

Les différentes étapes de la mise au point d'un tel modèle sont les suivantes : la calibration, l'étude de sensibilité puis la validation (Mesplé, 1993). Le but de la calibration est de déterminer le meilleur ajustement possible entre les données observées et simulées. L'analyse de sensibilité permet de hiérarchiser les paramètres en fonction de la sensibilité du modèle à leur variation. La validation consiste en la réalisation d'un test objectif permettant de comparer les valeurs observées aux valeurs calculées par le modèle sur un jeu de données différent de celui utilisé pour la calibration. Elle sera réalisée par l'évaluation de la qualité de la régression linéaire entre les valeurs observées et les valeurs modélisées suivant la méthode décrite par Mesplé et *al.*, (1996).

Les modèles statistiques sont eux construits en ne prêtant que peu d'attention aux mécanismes internes et reposent fortement sur la base de données ayant servi à la modélisation (Keller, 1989).

5.3.2. Données hydrauliques.

La Motta (1976) (dans Roques, 1980), à propos du traitement des eaux usées, définit N comme le flux de substrat, qui s'exprime par :

$$N = k_l \cdot (x - x_b)$$

avec : x : la concentration en substrat dans le liquide circulant
 x_b : la concentration en substrat à l'interface biofilm-liquide
 k_l : le coefficient de transfert coté liquide

Trois cas sont alors à considérer : si k_l est grand, le flux est conditionné par la vitesse d'utilisation du substrat par le biofilm bactérien et x n'est pas très différent de x_b ; on est alors en régime de réaction ; si k_l est petit, le flux est conditionné par la vitesse de diffusion du substrat dans le biofilm bactérien, x_b est quasi nul et on est en régime diffusionnel. Dans le cas général, N est conditionné à la fois par la vitesse de transfert et par la vitesse de métabolisation dans le biofilm bactérien.

Roques (1980) définit la charge hydraulique C_h , exprimée en $m^3 \cdot m^{-2}$ de filtre par jour. Elle représente la vitesse moyenne de circulation dans le filtre.

$$C_h = (Q + Q_r) / S$$

Avec : S la section du filtre biologique
 Q le débit de circulation
 Q_r le débit de recirculation

Pour des valeurs de C_h comprises entre 1 et 4, on est en faible charge et le fonctionnement est caractérisé par une faible production de boues (composées de la zoogléée sortant du filtre biologique) très peu fermentescibles, un bon rendement de dépollution du réacteur et un biofilm bactérien épais.

Pour des valeurs de C_h supérieures à 8, on est en forte charge : le régime est dit réactionnel. Il est caractérisé par une production importante de boues fermentescibles constituées de cellules bactériennes jeunes, un rendement de dépollution médiocre et un film biologique peu épais.

5.3.3. Le modèle de Bois et *al.*, (1997).

Les modèles établis sur les réseaux d'eau potable prennent en compte : le biofilm fixé sur les canalisations dont l'épaisseur est régie (1) par la vitesse de passage du fluide (souvent assez rapide : de l'ordre de $1 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$), (2) les nutriments disponibles et leur biodégradabilité, (3) les systèmes de contrôle des populations bactériennes (c'est-à-dire la chloration, l'ozonation

ou le traitement UV) et (4) le broutage dû au zooplancton (protozoaires et nématodes). D'autres travaux ont été réalisés sur le traitement des eaux usées, mais ils concernent principalement des réacteurs biologiques non immergés à travers desquels l'eau percole par gravité et sous lesquels de l'air est envoyé à partir du bas du filtre. Quelques études ont été réalisées en filtre immergé, mais pour des régimes hydrauliques dits laminaires.

Le modèle mis au point par Bois et *al.*, (1997) permet de présenter la structure des modèles sur les bactéries en milieux aquatiques et les paramètres pris en compte. Les tableaux n°1.7. et n°1.8. définissent les différents paramètres et la façon de les exprimer.

L'azote n'est pas pris en compte dans ce genre de modèle. En effet, les données bibliographiques donnent des valeurs de constantes de saturation comprises entre 28,8 et 9,5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de N-NH₃ et de 30,5 et 159 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de N-NO₃ (Reay et *al.*, 1999). Ces concentrations très faibles sont souvent dépassées dans les eaux naturelles et encore plus dans les eaux piscicoles très chargées en azote dissous.

Tableau n°1.8. Définitions et unités des constantes du modèle de Bois et *al.*, (1997).

Paramètres	Définitions	Unités
$Y_{x/s}$	Bactéries produites par mg de COD (rdt)	bactéries·mg ⁻¹ CODB
k_c	Constante d'affinité des bactéries pour le CODB	mg de CODB·l ⁻¹
V_{\max}	Vitesse maximale de consommation de CODB	mg CODB·bactérie ⁻¹ ·h ⁻¹
D	Taux de dilution dans le compartiment	h ⁻¹
$k_{\text{dét}}$	Constante de détachement des bactéries fixées dans le fluide circulant	h ⁻¹
k_{fix}	Constante de fixation des bactéries libres sur le biofilm	h ⁻¹
k_{mort}	Constante de mortalité	h ⁻¹
k_{Cl_2}	Constante de mortalité due à l'action du chlore	h ⁻¹
k_r	facteur de résistance au chlore des bactéries fixées	h ⁻¹
k_{lyse}	vitesse de lyse de cellules bactériennes mortes	h ⁻¹
m_b	masse d'une bactéries	mg
F_b	taux de carbone par bactérie	sans unité

Tableau n°1.7. Les paramètres pris en compte par le modèle de Bois et *al.*, (1997).

Paramètres	Equation	Commentaires
Bactéries fixées $\partial(B_f)/\partial t =$		
	$+ Y_{x/s} V_{\max} [\text{CODB}]/(k_c + [\text{CODB}]) [B_f]$	Taux de croissance
	$- k_{\text{dét}} [B_f]$	Détachement des fixées
	$+ k_{\text{fix}} [B_f]$	Fixation des libres
	$+ 1/D ([B_{\text{sortie}}] - [B_{\text{entrée}}])$	Renouvellement d'eau
	$- k_{\text{mort}} [B_f]$	Mortalité naturelle
	$- k_{\text{Cl}_2} / k_r [B_f]$	Mortalité due au chlore
Bactéries libres $\partial(B_l)/\partial t =$		
	$+ Y_{x/s} V_{\max} [\text{CODB}]/(k_c + [\text{CODB}]) [B_l]$	Taux de croissance
	$+ k_{\text{dét}} [B_l]$	Détachement des fixées
	$- k_{\text{fix}} [B_l]$	Fixation des libres
	$+ 1/D ([B_{\text{sortie}}] - [B_{\text{entrée}}])$	Renouvellement d'eau
	$- k_{\text{mort}} [B_l]$	Mortalité naturelle
	$- k_{\text{Cl}_2} [B_l]$	Mortalité due au chlore
Le carbone $\partial[\text{CODB}]/\partial t =$		
Organique	$+ 1/D ([\text{CODB}]_{\text{sortie}} - [\text{CODB}]_{\text{entrée}})$	Renouvellement d'eau
Dissous	$- Y_{x/s} V_{\max} [\text{CODB}]/(k_c + [\text{CODB}])$	Consommation des
Biodégradable	$([B_f] + [B_l])$	bactéries libres et fixées
(CODB)	$+ m_b k_{\text{lyses}} k_{\text{mort}} F_b ([B_f] + [B_l])$	Libération de CODB par la lyse des cellules mortes

5.4. Quantification des phénomènes pris en compte dans la modélisation bactérienne en milieu aquacole.

5.4.1. Les constantes de fixation et de détachement.

Bois et *al.*, (1997) fournissent des valeurs pour les paramètres $k_{\text{dét}}$ et k_{fix} pour des vitesses de passage de $1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Dans les différentes études bibliographiques, ces coefficients sont calculés pour un fluide passant dans une simple tuyauterie ou dans des filtres à charbon actif. Du point de vue hydraulique, ces systèmes sont assez éloignés des nôtres. Toutefois, le tableau n°1.9. ci dessous donne quelques valeurs de coefficient.

Tableau n°1.9. Exemple de valeurs de constantes de fixation et de détachement (modèle de Bois et *al.*, 1997).

Constante	Valeurs (h ⁻¹)	Références
de fixation	0,24 0,37	Haudidier 1987 dans Bois et <i>al.</i> , (1997)
de détachement	0,039 0,020	

5.4.2. La constante de mortalité des bactéries.

La mortalité des bactéries a plusieurs origines : la mortalité naturelle, le broutage, la toxicité d'un composé chimique, ou tout procédé bactéricide (chapitre 1. § 3.). Le broutage peut être dû aux protozoaires (Sherr et *al.*, 1986) et/ou aux nématodes (Traunspurger et *al.*, 1997).

D'après Billen et *al.*, (1992) dans le "Modèle de Chabrol" (unité de traitement d'eau potable), la mortalité des bactéries hétérotrophes non due au broutage est de l'ordre de 0,01 h⁻¹ à 20°C, alors que celle due au broutage, déterminée selon la méthode de Sherr et *al.*, (1986) serait de l'ordre de 0,01 à 0,8 h⁻¹. Ce modèle représente l'augmentation du nombre de bactéries attachées dans un filtre à charbon actif, épisodiquement traité avec un inhibiteur de protozoaires (colchicine / cycloheximide à une concentration finale de 100-200 mg.l⁻¹).

Billen et *al.* (1988) reprennent toutes les données sur les taux de croissance et de mortalité, calculés dans différents environnements aquatiques, avec la méthode utilisant le suivi de la thymidine marquée incorporée dans les cellules bactériennes. Ils observent que "le taux de croissance apparent est corrélé à la température, mais qu'il dépend aussi essentiellement de la phase de croissance de la population bactérienne (phase de latence, exponentielle et de déclin), alors que les taux de mortalité et de broutage sont constants quelque soit la phase de croissance : ils sont donc plus fortement corrélés à la température". Pour des températures de l'ordre de 22-23°C, les valeurs du taux de mortalité et du taux de broutage sont identiques à 0,011 h⁻¹. Ces valeurs correspondent à celles obtenues par Servais et *al.*, (1985) dans les eaux de la Meuse. Il faut remarquer que ces données sont obtenues pour des populations bactériennes non fixées sur un biofilm (or, le broutage de biofilm est un phénomène important (Pedersen, 1982)).

Bois et *al.*, (1997) utilisent une constante de mortalité de 0,021h⁻¹ pour les populations libres et fixées mais il n'y a pas de broutage dans ce modèle car il n'y a pas eu introduction ni de protozoaires ni de nématodes dans le pilote qui a servi aux expérimentations.

D'autres études, toujours sur des réseaux d'eau potable, distinguent les différents types de protozoaires rencontrés (tableau n°1.10).

Tableau n°1.10 : Les protozoaires dans les réseaux d'eau potable.

Phase	Dénombrement protozoaire	Répartition des protozoaires	Broutage	Références
Liquide	10^5 cellules·litre ⁻¹	flagellés 93% ciliés 18% thécamoebiens 16% amibes nues 11%		Sibille et al. (1998)
Solide (biofilm)	10^3 cellules·cm ⁻²	ciliés 52% thécamoebiens 48%	2 bactéries·ciliés ⁻¹ ·h ⁻¹	
Liquide		flagellés 94% ciliés 3% (dominantes en terme de biomasse) amibes nulles à 3%		Amblard et al., (1998)
Liquide		pas recherchée	0 à 0,021 h ⁻¹ 0,011 h ⁻¹ à 24°C	Servais et al., (1985)
Solide (biofilm)		cilié: Euplotes sp.	120 à 882 bactéries·cilié ⁻¹ ·h ⁻¹ *	Lawrence et Snyder (1998)

* respectivement *V. natriegens* et *P. fluorescens*.

5.4.3. Les rendements bactériens.

Les bactéries utilisent comme source d'énergie le carbone organique dissous, soit directement, soit après hydrolyse extra cellulaire du carbone particulaire. Tout le carbone n'est pas assimilable et la fraction du COD assimilable (CODB) est très variable d'un écosystème à un autre et doit donc être mesurée dans nos conditions. Deux méthodes sont envisageables pour déterminer la part du COD assimilable par les bactéries du système. La première méthode est proposée par Van der Kooij et al., (1982). Elle est basée sur un bio-essai utilisant la souche *Pseudomonas fluorescens* P17 (capable d'utiliser de nombreuses sources de carbone) comme souche test. Leurs essais ont porté sur différents types d'eau prélevée en différents points d'unités de traitement d'eau potable. Le pourcentage de carbone organique assimilable par rapport au carbone organique dissous est compris entre 0,09 et 0,9 %. Après un traitement à l'ozone, il évolue entre 1,03 et 5,96 % (Van der Kooij et al., 1982). Avec cette

même méthode appliquée à une unité pilote de traitement d'eau potable, Haudidier et *al.*, (1988) trouvent que le carbone organique assimilable (COA) représente 5 % du carbone organique total

Servais et *al.*, (1987) utilisent une seconde méthode n'utilisant pas la souche de référence mais les bactéries collectées dans l'eau à analyser. Leurs résultats sont très différents de ceux de Van der Kooij, puisque la part de COA dans le COD est comprise entre 10 et 60 %, les valeurs les plus élevées étant obtenues pour des eaux urbaines polluées et les valeurs les plus basses pour des eaux de mer ou de rivière dites non polluées (rapport COA/COD compris entre 20 et 35 %). Dans ces eaux, le COD est constitué des rejets du phytoplancton et de substances humiques.

Dans les circuits d'élevage piscicole, on peut distinguer deux types de carbone organique : le carbone organique dissous provenant de la lyse des cellules bactériennes et de l'excrétion des poissons et le carbone organique particulaire contenu dans les fèces des poissons. Les bactéries hétérotrophes peuvent utiliser soit le COD directement, soit le carbone organique particulaire après l'avoir hydrolyser en molécules dissoutes. Cette hydrolyse est extracellulaire, elle a lieu suite à l'action d'hydrolases produites dans le milieu (le biofilm) par les bactéries elles-mêmes. En ce qui concerne le COD provenant des fèces des poissons, il n'y a pas de données bibliographiques permettant de l'évaluer. En revanche, en ce qui concerne la lyse bactérienne, le tableau n°1.11, ci-dessous donne les différents paramètres qui permettent de calculer.

Tableau n°1.11. Quantification de l'apport de carbone dû aux bactéries.

Paramètres	Valeurs	Références
K_{lyse}	0,011 h ⁻¹	Evrard (commun. perso.)
Taux de lyse des populations bactériennes mortes		dans Bois et <i>al.</i> , (1997)
	0,0009h ⁻¹	Bois et <i>al.</i> , (1997)
$F_{bact/S}$	0,46 (sans unité)	Evrard (commun. perso.)
Fraction d'une bactérie que l'on retrouve sous forme de carbone après la lyse bactérienne		dans Bois et <i>al.</i> 1997
Masse d'une bactérie	2·10 ⁻¹⁰ mg de matière sèche	Bois et <i>al.</i> , 1997

La production de carbone à partir des bactéries mortes s'exprime par :

$$\partial[\text{CODB}]/\partial t = K_{\text{lyse}} [\text{Bmort}_{\text{l+f}}] F_{\text{bact/s}} m_{\text{bact}}$$

avec : $\text{Bmort}_{\text{l+f}}$: bactéries mortes issues des populations libres et fixées (UFC)

K_{lyse} : taux de lyse des populations bactériennes mortes

$F_{\text{bact/s}}$: fraction d'une bactérie que l'on retrouve sous forme de COD après sa lyse

m_{bact} : masse d'une bactérie

L'utilisation du substrat par les micro-organismes suit une cinétique de type Michaelis-Menten. Les variations de concentration du substrat en fonction de la biomasse bactérienne sont représentées par:

$$\partial S/\partial t = Y_{x/s} \cdot b_{\text{max}} \cdot B \cdot S / (S + K_s)$$

avec: B : la biomasse bactérienne exprimée en bactéries (UFC)

$Y_{x/s}$: le rendement de production de bactéries par mg de substrat carboné (UFC·mg⁻¹)

b_{max} : la vitesse maximale d'utilisation du substrat par bactérie en (mg·UFC⁻¹·h⁻¹)

S : la concentration en substrat en mg·l⁻¹

K_s : la constante d'affinité du substrat en mg·l⁻¹

Remarque : on appelle souvent V_{max} ou μ_{max} (en h⁻¹) le rapport entre b_{max} et $Y_{x/s}$.

Dans le "Sancho Model" (Servais et al., 1995 dans Gagnon et al., 1997) et le "Chabrol model" (Billen et al., 1992), le carbone organique biodégradable est sous la forme de macromolécules plus ou moins polymérisées et qui doivent d'abord être hydrolysées par les bactéries en de plus petites molécules monomériques avant d'être incorporées dans la cellule et assimilées. Ces modèles distinguent deux types de COD hydrolysable en fonction de la vitesse d'hydrolyse lente ou rapide du COD en substrat S assimilable. Le taux de croissance est alors donné par l'expression de Menten et la vitesse d'apparition du substrat S en fonction des deux types de carbone hydrolysable s'exprime par :

$$\partial S/\partial t = V_{1\text{max}} H_1 / (H_1 + k_{s1}) + H_2 / (H_2 + k_{s2}) - b_{\text{max}} S / (S + K_s) B - (S - S_0) / D$$

Avec H_1 et H_2 : les concentrations en carbone rapidement et lentement hydrolysable (respectivement) en mg·l⁻¹.

k_{s1} et k_{s2} : les constantes d'affinité du carbone rapidement et lentement hydrolysable

$V_{1\text{max}}$ et $V_{2\text{max}}$: la vitesse maximale d'hydrolyse par les bactéries du carbone rapidement et lentement hydrolysable

S : la concentration en substrat assimilable

K_s : la constante d'affinité du carbone assimilable.

b_{max} : la vitesse maximale d'utilisation du substrat par bactérie

Le tableau n°1.12. donne les valeurs de constantes V_{max} et k_s trouvées dans la bibliographie.

Tableau n°1.12. Valeurs de taux de croissance.

Paramètres	Valeurs	Références
V_{1max}	0,75 h ⁻¹	
k_1	0,25 mgC·l ⁻¹	
V_{2max}	0,25 h ⁻¹	Billen et <i>al.</i> , 1992 The Chabrol model.
k_2	0,25 mgC·l ⁻¹	
V_{max}	1,2 h ⁻¹	
$Y_{x/s}$	0,2 mg de bactérie·mgC ⁻¹	
K_s	0,05 mgC·l ⁻¹	
K_s	0,075 mgC·l ⁻¹	
$\mu_{max} = V_{max} \times Y_{x/s}$	0,043 h ⁻¹	
$\mu_{max} = V_{max} \times Y_{x/s}$	0,0326 h ⁻¹	Mathieu et <i>al.</i> , (1992); van der Kooij et <i>al.</i> , (1982) ; Bois et <i>al.</i> , (1997)
$\mu_{max} = V_{max} \times Y_{x/s}$	0,067 h ⁻¹	
K_s	0,0028 mgC·l ⁻¹	
K_s	0,0022 mgC·l ⁻¹	
K_s	1,2 mg C·l ⁻¹	
μ apparent calculé entre l'entrée et sortie de chaque réacteur, le temps de rétention: 40h ⁻¹ , les dénombrement sont effectués en epifluorescence (flore totale)	0,018 h ⁻¹	Haudidier, 1988. [COD] compris entre 2,04 et 1,41 mg·l ⁻¹ . % de COA de 5% (méthode de Van der Kooij et <i>al.</i> , 1982), probablement beaucoup plus 30 à 50 %.
μ apparent Bactéries actives (epifluorescence)	0,056 h ⁻¹	Haudidier, 1988
μ apparent flore hétérotrophe cultivable	0,068 h ⁻¹	Haudidier, 1988

5.4.4. Les inhibiteurs de croissance.

Les facteurs inhibiteurs de croissance sont introduits comme des correctifs du taux de croissance, sous la forme d'un coefficient multiplicatif de type exponentiel (Bois et *al.*,

1997) : $\mu \cdot e^{(-k_{inact} [Cl_2])}$, k_{inact} étant la constante d'inactivation des bactéries par le chlore. Bois et al., (1997). prennent comme valeur de k_{inact} $0,5 \text{ h}^{-1}$ dans la distribution avant calibration et $0,35 \text{ h}^{-1}$ comme valeur calibrée.

On peut encore ajouter la température comme facteur influençant la croissance bactérienne. La relation entre le taux de croissance bactérien et la température T peut être décrite grâce à la loi d'Arrhénius qui utilise une fonction du type $A e^{BT}$. Les valeurs du coefficient B , obtenues pour des bactéries hétérotrophes marines, sont assez proches : 0,217 Iriberry et al., (1985), 0,21 pour Maita et Yanada (1978) et 0,216 pour la consommation réelle et 0,184 pour la consommation brute (Bôlter, 1982).

CHAPITRE 2. MATERIEL ET METHODES

1. LES CIRCUITS EXPERIMENTAUX UTILISES.

1.1. Descriptions générales.

Trois types de circuits expérimentaux ont été utilisés. Ces circuits sont installés dans une salle à l'abri des fluctuations climatiques ; L'un d'entre eux a un volume de 24 m^3 et les deux autres, identiques, ont un volume de 6 m^3 . Ils sont constitués de deux bassins connectés en parallèle à une boucle de recyclage. La lumière est artificielle, assurée par un éclairage indirect de 15 Lux, avec une photopériode de 16 heures d'éclairage par jour.

1.1.1. Le circuit pilote de 24 m^3 .

Le circuit de 24 m^3 a été construit dans les années 1990, pour servir de circuit pilote expérimental de grossissement de poisson en système recirculé (fig. n°2.1. et tableau n°2.1.). Il est conçu pour recevoir des charges importantes de poisson (entre 40 et $100 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$).

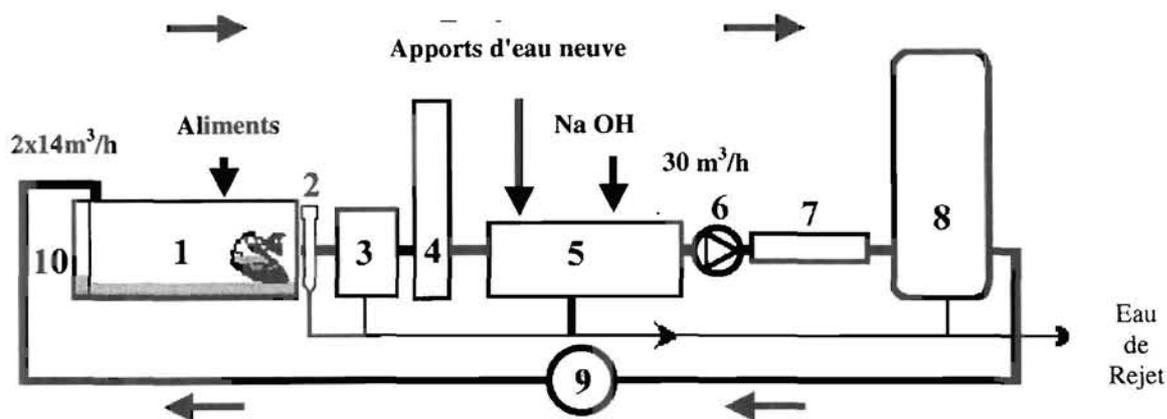


Figure n°2.1. Schéma du système d'élevage en eau recyclé.

- | | |
|--|------------------------------|
| 1. bassin d'élevage (x2) | 6. pompe de recirculation |
| 2. piège à particule | 7. réacteur UV |
| 3. filtre mécanique | 8. filtre biologique |
| 4. colonne de dégazage (CO_2) | 9. régulateur de température |
| 5. bac tampon | 10. système d'oxygénation |

Tableau n°2.1. Caractéristiques des différents compartiments du circuit pilote de 24 m³.

Numéro sur la fig. n°2.1.	Compartiments	Fonctions	Caractéristiques
1	2 bassins	Elevage des poissons	Octogonaux à fond plat, 10 m ³ , 22 m ² de parois de bassin, débit 14 m ³ ·h ⁻¹
2	Piège à particules	Récupération des fèces et du non ingéré	Concept AquaOptima, vidange quotidienne
3	Filtre mécanique	Récupération des MES inférieures à 50µm	Filtration tangentielle, maille de 50µm, nettoyage automatique à l'eau douce
4	Colonne de dégazage	Dégazage du CO ₂ sursaturation	Contre courant air/eau dans une colonne en remplie d'anneaux ETAPAC, traitement de 2 m ³ ·h ⁻¹ du débit circulant
5	Bac tampon	Régulation du pH = 7,2 ± 0,2 Apport d'eau neuve	Apport de soude Volume de 1,5 m ³
6	Pompe	Circulation dans le circuit	30 m ³ ·h ⁻¹ Pompe plastique à entraînement magnétique
7	Réacteur UV	Contrôle des bactéries	75 J·cm ⁻²
8	Filtre biologique	Nitrification	3 m ³ rempli par du garnissage argileux, micro poreux (Biogrog), nettoyage par lavage (courant d'eau inverse du courant de fonctionnement)
9	Régulateur température	de 22 ± 1 °C	Echangeur thermique
10	Oxygénation	Maintien 6 mg·l ⁻¹ d'O ₂	Bullage d'oxygène pur

L'eau neuve est prélevée en mer à 4,5 mètres de profondeur. Elle est filtrée sur filtre à sable, puis envoyée dans le système d'élevage au niveau du bac tampon. Le mélange de l'eau neuve avec l'eau du circuit est effectué dans le bac tampon, puis pompé dans le réacteur UV. L'eau d'entrée est ainsi traitée afin de limiter les possibilité de contaminations bactériennes par l'eau neuve. Le réacteur UV et le filtre biologique sont séparés par 20 mètres de canalisation.

1.1.2. Les circuits expérimentaux de 6 m³.

Les deux circuits expérimentaux de 6 m³ sont basés sur les mêmes principes de fonctionnement que le circuit pilotes de 24 m³ décrit précédemment, mais la biomasse de poissons est limitée à 10 kg·m⁻³ car il n'y a pas de système de suroxygénation. La concentration en oxygène est ramenée à 100 % de la saturation par une colonne de dégazage, qui élimine aussi le CO₂ produit par la respiration des poissons. Le réacteur UV est placé directement avant le filtre biologique et la filtration biologique est placée après la pompe de recirculation. La figure n°2.2. et le tableau n°2.2. présentent les caractéristiques de ces circuits.

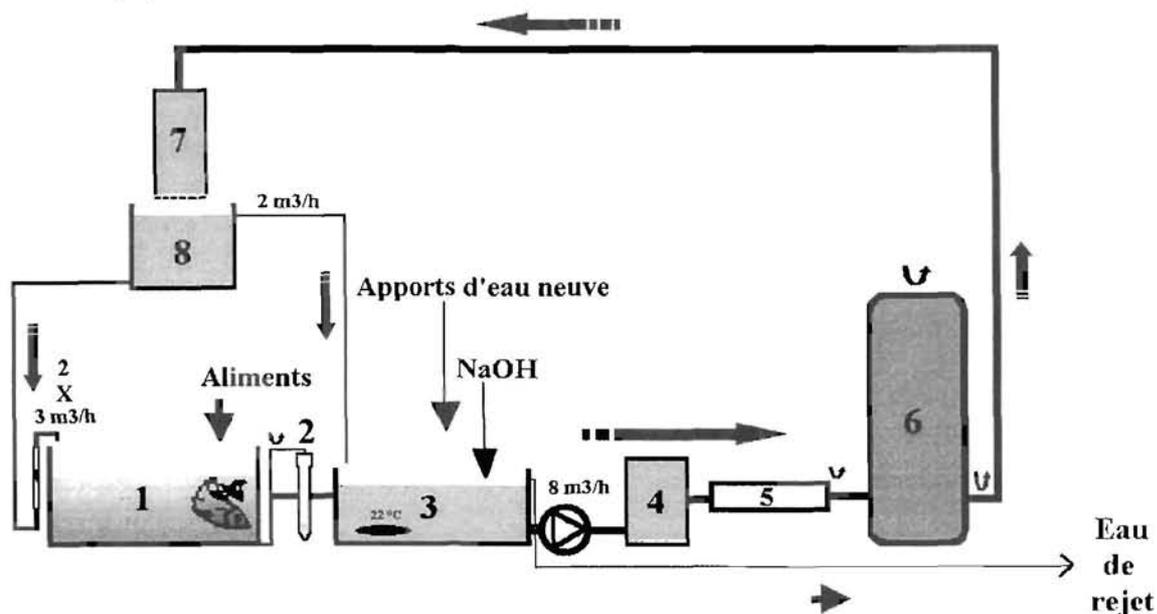


Figure n°2.2. Schéma des circuits expérimentaux de 6 m³.

- | | |
|---------------------------|--|
| 1 : Bassin d'élevage (x2) | 5 : Réacteur UV |
| 2 : Piège à particules | 6 : Filtre biologique |
| 3 : Bac tampon | 7 : Colonne de dégazage (CO ₂ et O ₂) |
| 4 : Filtre mécanique | 8 : Bac de charge |

Tableau n°2.2. Caractéristiques des différents compartiments des circuits de 6 m³.

Numéro sur la fig. n°2.2.	Compartiments	Fonctions	Caractéristiques
1	2 bassins d'élevage		Ronds à fond convexe, 2 m ³ , débit 4 m ³ ·h ⁻¹
2	Piège à particule	Récupération des fèces et du non ingéré	Vidange quotidienne
3	Bac tampon	Régulation du pH =7,8 ± 0,2	Apport de soude 1 m ³
3'	Pompe	Apport d'eau neuve	
		Circulation dans le circuit	10 m ³ ·h ⁻¹ Pompe plastique à entraînement magnétique
4	Filtre mécanique	Récupération des MES	Filtre "chaussette" maille de 50µm, changement des chaussettes tous les jours
5	Réacteur UV	Contrôle des bactéries	20 J·cm ⁻²
6	Filtre biologique	Nitrification	0,6 m ³ rempli de garnissage micro-poreux (Biogrog) Pas de lavage du filtre biologique
7	Colonne de dégazage	Dégazage CO ₂ sursaturation oxygénation	du Contre courant air/eau dans une colonne en remplie d'anneaux ETAPAC, tout le débit est traité
8	Bac de charge		Volume: 0,5 m ³

1.2. Les différents éléments du circuit.

1.2.1. Le système d'alimentation.

La figure n°2.3. présente le système de distribution de l'aliment. Il s'agit d'un système d'auto-alimentation qui permet aux poissons de s'alimenter à volonté. Le cache autour de la tige tactile permet d'éviter les contacts non volontaires entre les poissons et la tige, de façon à ne distribuer de la nourriture qu'en cas de demande et à limiter le gaspillage (Covès et al., 1998).

Afin de quantifier le gaspillage (les granulés non ingérés), chaque bassin est équipé d'un piège à particules qui piège récupère les plus grosses particules : la majeure partie des granulés et, dans le cas du bar, seulement 30 % des fèces. Les granulés sont repérés et comptés à travers la paroi transparente du piège à particules. La vidange quotidienne des pièges permet de quantifier jour après jour le non ingéré. L'ingéré quotidien (I_Q) pour chaque bassin s'exprime donc par :

$$I_Q = \text{Ration quotidienne} - (\text{Reste dans le silo} + \text{Non ingéré})$$

Le non ingéré est obtenu par le produit du nombre de granulés piégés et du poids d'un granulé.

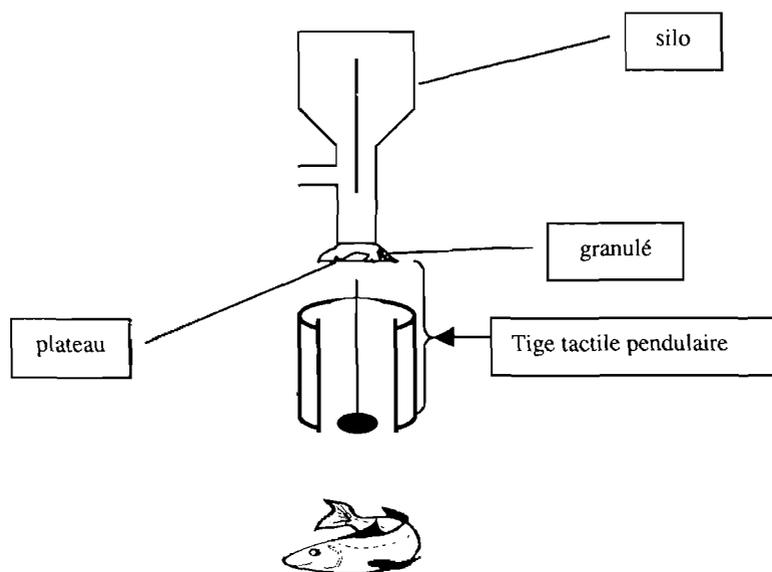


Figure n°2.3. Système de distribution de l'alimentation en auto-alimentation.

1.2.2. La filtration mécanique.

La filtration mécanique dans le circuit pilote de 24 m³.

La filtration dans le circuit de 24 m³ est réalisée par un filtre Hydrotech. C'est une filtration frontale, sur des plaques dont le diamètre des pores est de 50 μm. La surface du filtre est nettoyée automatiquement par un jet d'eau douce, lorsque la cellule photoélectrique intégrée à ce filtre détecte une forte accumulation de matière sur la grille du tamis. Les eaux de rinçage sont évacuées sans être mélangées à l'eau du circuit.

La filtration mécanique dans les circuits expérimentaux de 6 m³.

La filtration est réalisée par deux filtres à poches (CHF X100) placés en parallèle juste après la pompe. Ces filtres utilisent des poches de mailles différentes que l'on peut changer sans perdre d'eau. Des mailles de 50 μm (FSI BPONG X 01) sont utilisées. Ce système de filtration nous permet de maintenir un débit constant de 10 m³·h⁻¹ pendant 24 heures. Les poches sont changées tous les jours.

1.2.3. La filtration biologique.

La filtration biologique est réalisée dans des réacteurs remplis d'un garnissage minéral de type BIOGROG. Le volume utile est $0,6 \text{ m}^3$ dans les circuits expérimentaux de 6 m^3 et 3 m^3 dans le circuit pilote de 24 m^3 . La filtration biologique permet une transformation de l'ammoniaque produite par les poissons en nitrates, sans formation de nitrites. De façon à vérifier le bon fonctionnement du filtre biologique, les trois formes d'azote minéral ($\text{N-NH}_3 + \text{NH}_4$, N-NO_2 et N-NO_3) sont dosées toutes les semaines.

Sur les circuits expérimentaux de 6 m^3 , afin de pouvoir réaliser des bilans de matière et ne pas avoir de pertes de matière organique, aucun lavage du filtre biologique n'est réalisé pendant les expérimentations. Dans le circuit pilote de 24 m^3 , deux lavages sont réalisés par semaine, dont l'un la veille des prélèvements.

1.2.4. La colonne de dégazage.

Les colonnes de dégazage permettent de remettre tous les gaz en solution dans l'eau à 100 % de saturation. Elles sont constituées par une colonne (fig. n°2.4.) dans laquelle l'eau et l'air (mis en mouvement par un extracteur) circulent à contre-courant. Dans nos élevages, elles servent à la fois à éliminer le CO_2 et à oxygéner l'eau.

Dans les circuits de 6 m^3 , la colonne est placée en position intermédiaire entre le filtre biologique et le bac de charge qui alimente directement les bassins. Elle sert de système d'oxygénation et permet d'obtenir, en sortie de colonne, une eau saturée en oxygène. Compte tenu du taux de renouvellement de chaque bassin de 200% par heure, d'une concentration minimum dans le bassin en O_2 de $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ et de la consommation en O_2 par kg de biomasse (Lemarié et *al.*, 1992), nous ne pouvons dépasser une charge de 15 kg de poissons par m^3 .

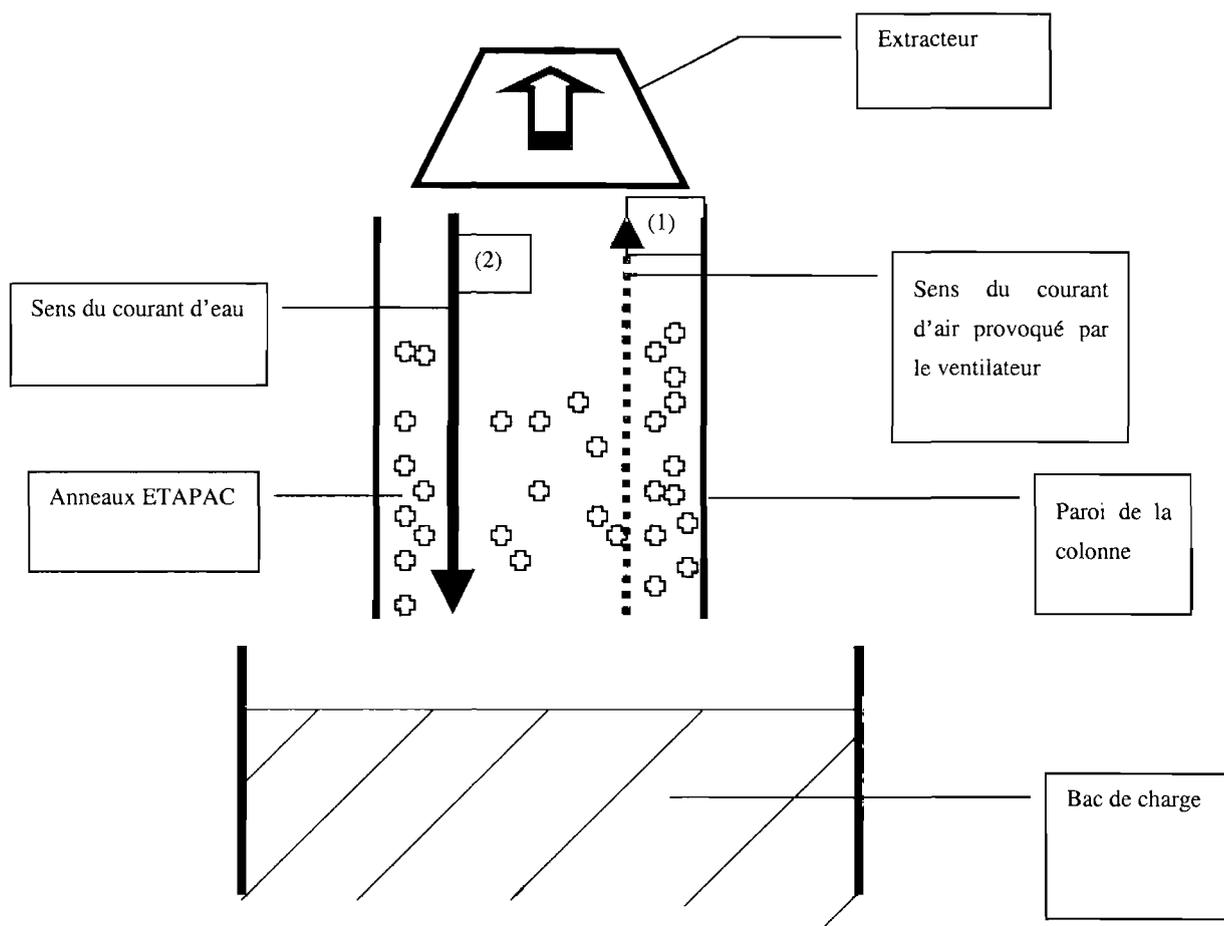


Figure n°2.4. Schéma du principe de la colonne de dégazage.

1.2.5. Maintien du pH et de la température.

L'activité métabolique des poissons et des bactéries du système conduit à une baisse du pH, qui est compensée par un apport de soude. Le pH du circuit est mesuré chaque jour et un apport de soude concentrée ($1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) est effectué, si nécessaire, afin de maintenir le pH à : $7,2 \pm 0,2$ dans le circuit pilote de 24 m^3 et $7,8 \pm 0,2$ dans les circuits expérimentaux de 6 m^3 . L'apport se fait dans le bac tampon par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique à faible débit qui prélève dans un bac de soude.

Le réglage de la température se fait aussi au niveau du bac tampon. Il est réalisé par une résistance électrique, contrôlée par une sonde thermique. Une température de 22°C est maintenue dans les circuits d'élevage. En été, en raison des faibles renouvellements en eau et de l'absence de système de refroidissement la température des circuits dépasse 22°C . De façon à prendre en compte la température d'élevage, la température est mesurée chaque jour.

1.2.6. Système d'ozonation.

Le système d'ozonation fourni par la société Air Liquide a été installé dans un des circuits expérimentaux de 6 m³, à la place du réacteur UV (fig. n°2.5.). Il est composé de deux principaux éléments :

- un réacteur (300 litres) dans lequel le gaz ozoné est injecté à travers un poreux,
- un dispositif permettant de mesurer la quantité d'ozone contenu dans le gaz d'alimentation du réacteur d'ozonation.

L'ozone est fourni par un ozoneur (MESSTECHNIK, BMT 802) alimenté en oxygène pur.

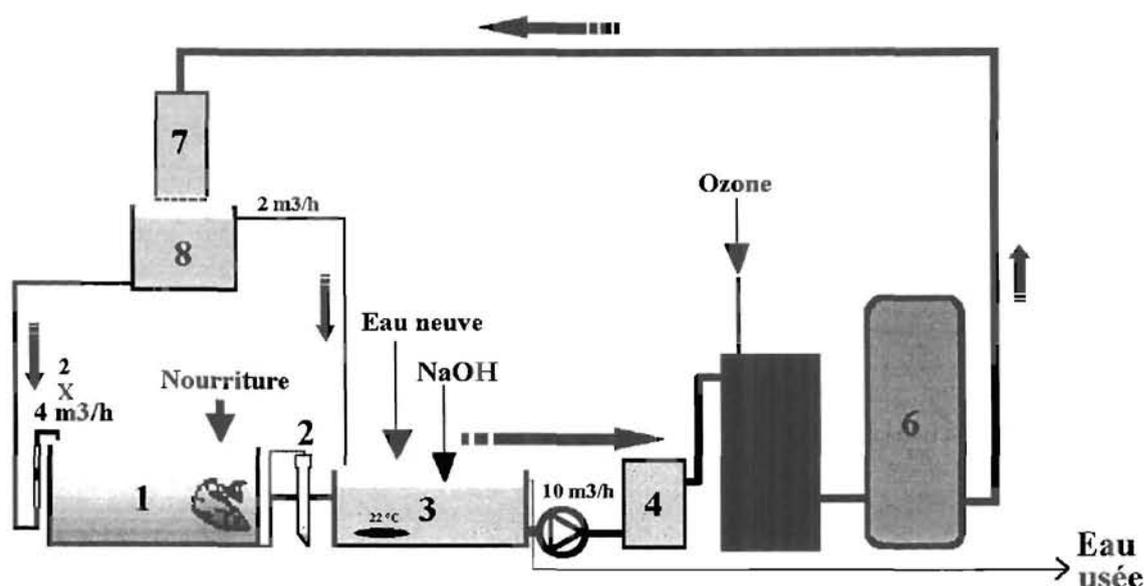


Figure n°2.5. Schéma du système d'élevage (circuit expérimental de 6 m³) avec le réacteur d'ozonation.

- | | |
|---------------------------|--------------------------|
| 1 : Bassin d'élevage (x2) | 5 : Réacteur d'ozonation |
| 2 : Piège à particules | 6 : Filtre biologique |
| 3 : Bac tampon | 7 : Colonne de dégazage |
| 4 : Filtre mécanique | 8 : Bac de charge |

2. LES POISSONS.

2.1. Origine et conditions d'élevage des poissons.

Les poissons utilisés au cours de l'expérimentation proviennent d'élevages larvaires réalisés à la station IFREMER de Palavas. Les œufs sont obtenus par ponte induite sur géniteurs captifs (sex-ratio 2/3) de bar (*Dicentrarchus labrax*). La conduite des élevages se

divise ensuite en 2 grandes périodes : la première correspondant aux phases larvaires (sevrage et alevinage) est effectuée en circuit recyclé et la seconde correspondant au pré-grossissement se déroule en circuit ouvert protégé (filtre mécanique, UV). Dans le but d'obtenir des poissons aussi standards que possible, les conditions d'élevage sont contrôlées : la photopériode est de 16 heures de jour / 8 heures de nuit et les paramètres d'élevage sont adaptés à chaque phase de développement selon le protocole décrit par Covès et Gasset, 1993.

Les poissons ont une période de 15 jours d'adaptation à leurs nouvelles conditions d'élevage. A l'issue de cette période, ils s'auto-alimentent de façon régulière.

2.2 Les paramètres zootechniques mesurés.

Les paramètres zootechniques suivis pour évaluer l'effet du traitement sur les performances biologiques des poissons sont les suivants :

2.2.1. L'évolution du poids moyen.

Le poids moyen est la moyenne des poids de tous les poissons de chaque bassin. Les poids individuels sont mesurés de la façon suivante :

- les poissons sont mis à jeun la veille de chaque pesée ;
- l'anesthésiant (phénoxy-éthanol) est utilisé à des doses allant de 150 à 300 mg.l⁻¹ (pour le stockage et pour les pesées respectivement) ;
- un traitement antibactérien préventif par bain est effectué (à raison de 20 mg.l⁻¹ de furazolidone), afin de pallier d'éventuelles infections consécutives aux blessures occasionnées au cours des manipulations ;
- un fort bullage en oxygène pur est en place pendant toute la durée de la manipulation, de façon à éviter la mort des poissons par asphyxie.

2.2.2. Le taux d'alimentation journalier (TAJ).

Le TAJ est calculé par :

$$TAJ(\%) = \frac{QTAI}{NJA * [(Bi + Bf) / 2]} * 100$$

Avec QTAI = Quantité Totale d'Aliment Ingéré (kg)

NJA = Nombre de jours d'alimentation

Bi = Biomasse initiale (kg)

Bf = Biomasse finale (kg)

2.2.3. L'indice de conversion alimentaire net (IC).

L'indice de conversion est calculé à partir du poids d'aliment ingéré et du gain de biomasse (Pagand et *al.*, 2000) :

$$I.C. = \text{Quantité d'aliment ingéré} / (Bf - Bi)$$

Avec Bf = Biomasse finale (kg)

Bi = Biomasse initiale (kg)

Quantité d'aliment ingéré en kg.

2.2.4. Le taux de croissance spécifique ou taux de croissance journalier (TCJ).

Le taux de croissance spécifique correspond à la croissance pondérale moyenne quotidienne du poisson. Il est exprimé en % par jour (Pagand et *al.*, 2000):

$$TCS = \frac{\ln(Pmf) - \ln(Pmi)}{\text{temps}} * 100$$

Avec Pmi = Poids moyen initial (kg)

Pmf = Poids moyen final (kg)

Temps : jour.

2.3. Observation des branchies.

2.3.1. Histologie classique.

Les échantillons sont réalisés sur des animaux tués par le froid, leurs arcs branchiaux sont immédiatement prélevés puis :

- fixés dans du liquide de Bouin,
- déshydratés dans l'éthanol puis le butanol,
- fixés dans la paraffine.

Des coupes d'environ $7\mu\text{m}$ sont réalisées. La coloration utilisée est celle de Mann-Dominici avec ajout de Harris hématoxyline et d'éosine. Les coupes sont observées au microscope optique (Cabe, 1968).

2.3.2. Observations en microscopie électronique (transmission).

Les arcs branchiaux sont conservés dans une solution de glutaraldehyde, tamponnée avec une solution de cacodylate de sodium (0,4 M) à pH 7,2. Les tissus sont fixés dans une solution 0,4 M de cacodylate de sodium (pH 7,2) de OsO₄ (1%) puis coulés dans la résine Epon. Les coupes fines sont contrastées avec une solution saturée d'acétate d'uranyl dans 50% d'éthanol et placées dans une solution de citrate suivant la méthode décrite par Reynolds (1963). Les coupes semi-fines sont colorées avec du bleu de toluidine et observées en microscopie classique.

2.4. L'alimentation.

L'aliment, de type Ecolife 17 extrudé pour bar (annexe 2.1.), est fourni par la société BIOMAR. Pendant la période couvrant la manipulation, nous avons distribué la même granulométrie d'aliment quel que soit le poids moyen des poissons.

La composition élémentaire de l'aliment est donnée dans le tableau n°2.3.. Cet aliment contient 12% d'eau.

Tableau n°2.3. Composition élémentaire des aliments (Ecolife 17).

Elément	Quantité en g par kg d'aliment brut
C	400
N	67
P	11,5

3. ÉTUDE DES POPULATIONS BACTERIENNES HETEROTROPHES.

3.1. Les Prélèvements.

3.1.1. Les bactéries circulantes.

Les prélèvements d'eau sont réalisés à partir de vannes d'eau qui sont nettoyées la veille et juste avant le prélèvement selon le protocole suivant :

- 1 : ouvrir et refermer la vanne plusieurs fois ;
- 2 : asperger la vanne avec de l'alcool à 70% et laisser agir 5 minutes ;
- 3 : ouvrir la vanne au maximum et la refermer plusieurs fois ;
- 4 : laisser la vanne ouverte pendant 10 minutes ;
- 5 : juste avant chacun des prélèvements, asperger à nouveau la vanne avec de l'alcool à 70%, puis laisser la vanne ouverte sans modifier son ouverture jusqu'à ce que le prélèvement soit réalisé.

3.1.2. Les bactéries fixées.

Sur le circuit pilote de 24 m³, deux lavages du filtre biologique sont effectués par semaine. Pour ce circuit, les prélèvements sont réalisés le lendemain d'un lavage. Pour les circuits de 6 m³, aucun lavage n'est réalisé.

Pour les populations fixées sur les parois :

Le niveau de l'eau du bassin d'élevage est abaissé de 20 cm et les prélèvements sont réalisés immédiatement.

Deux surfaces de 100 cm² sont grattées à l'aide d'un rasoir stérile de façon à récupérer tout ce qui s'est développé ou déposé sur cette surface.

Pour les populations du filtre biologique :

Le filtre biologique est court-circuité et quelques centaines de grammes de garnissage sont prélevés aseptiquement en haut du filtre biologique.

3.2. Revivification.

Elle est réalisée au moyen d'un liquide de revivification (3,4% NaCl ; 0,03% d'Extrait de Levure) (Kogure *et al.*, 1979 ; Peele et Colwell, 1981 ; Singh *et al.*, 1990); le pH ajusté à 7,6 . Le milieu est stériliser pendant 20 minutes à 121°C. Cette phase dure une durée de 45 minutes et est effectuée à température ambiante. Au début de cette phase de revivification, l'échantillon est placé pendant 10 minutes aux ultrasons (50kHz, 50W).

Pour les populations libres dans l'eau, 10 ml sont placés dans 90 ml de liquide de revivification. Pour les prélèvements solides, chaque prise d'essai est placée dans 200 ml de liquide de revivification.

3.3. Isolement.

Les dilutions sont réalisées dans de l'eau salée (3,4% NaCl ; pH ajusté à 7,6 ; stérilisation pendant 20 minutes à 121°C). 0,1 ml de chaque chacune des dilutions est étalé en double sur du Marine Agar Difco 2216 pour évaluer la flore totale et sur gélose TCBS pour dénombrer les bactéries de la famille des vibronaceae. Les boîtes de Pétri sont placées dans une étuve à 25°C pendant 10 jours.

3.4. Numération.

Le nombre d'unités formant colonie (UFC) est calculé à partir de la moyenne des colonies présentes sur les deux boîtes de Pétri de la dilution retenue. Celle-ci correspond aux boîtes ayant entre 30 et 300 colonies.

3.5. Expression des résultats.

Pour les échantillons liquides et les prélèvements dans les filtres biologiques, les données sont exprimées par la moyenne des nombres de bactéries sur les deux boîtes correspondant à la dilution choisie, plus ou moins l'intervalle de confiance à 95% : Moyenne $\pm 1,96 \cdot \sqrt{(\sigma^2/n)}$ (Guiraud, 1998). Les prélèvements sur les parois, les prélèvements sont réalisés en double et les résultats sont exprimés comme la moyenne plus ou moins la déviation standard. Les résultats sont exprimés en UFC par ml, par gramme de garnissage humide ou par cm^2 .

3.6. Caractérisation des populations dominantes.

20% des colonies sont sélectionnées de façon aléatoire pour être isolées en culture pure, à partir d'une boîte de Pétri contenant entre 30 et 300 colonies. Les critères suivants sont alors étudiés sur les cultures jeunes (19-24h) : morphologie de la colonie, couleur, forme des cellules, oxydase, catalase, type respiratoire, gram, résistance au vibriostatique O.129 (2.4 Diamino, 6.7 diisopropyl pteridine). De plus, une galerie API 20 E (bioMérieux) est ensemencée à partir d'une suspension dense réalisée dans un milieu permettant un meilleur développement des souches marines (NaCl 3,4% et Extrait de Levure 0,03 % ; pH ajusté à 6,8). Les bactéries sont identifiées en suivant les caractéristiques données par le Bergey's Manual.

3.7. Observation du garnissage : microscopie électronique (balayage).

Les échantillons sont préalablement rincés dans une solution de formiate d'ammonium ($68 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) isotonique à l'eau de mer à 34 ‰ de salinité. Ils sont ensuite séchés à l'étuve à 70°C pendant 2 heures (Aminot et Chaussepied, 1983). Une couche de platine de 10 nm est déposée sur les échantillons qui sont ensuite observés sur un microscope électronique à balayage haute résolution (JSM 6300F scanning Microscope).

4. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES.

4.1. Les paramètres physico-chimiques des eaux.

Le tableau n°2.4. présente les paramètres physico-chimiques suivis et les méthodes d'analyse correspondantes.

Tableau n°2.4. Paramètres physico-chimiques suivis et méthodes d'étude.

Paramètres	Méthodes	Matériel	Références
pH	Electrode combinée Ag/AgCl en verre	Consert ION/EC Meter	
salinité	Réfractométrie	réfractomètre ATAGO S10	
Azote ammoniacal	Spectrophotométrie	Technicon Autoanalyser II	AFNOR T 90-012
Nitrites	Spectrophotométrie	Technicon Autoanalyser II	AFNOR T 90-15
Nitrates	Spectrophotométrie	Technicon Autoanalyser II	AFNOR T 90-15
Ntotal	Minéralisation à chaud (121°C, +1atm) en présence de persulfate de potassium	Autoclave	Solerzano et Sharp, 1980
COD	Minéralisation à 625°C, acidification à pH<2 et bullage 15minutes	TOC 5000 (shimadzu),	
Ozone dans un gaz		BMT 961 TC	
OTR	Mesure de l'absorbance à 420 nm en présence de N,N-Diethyl-p-Phénylènediamine (DPD).	Spectrophotomètre HACH DR/2010	Rodier (1984)
couleur	- 455 nm Unité Platine Cobalt	Spectrophotomètre HACH DR/2010	Rodier (1984)
SH	Cf. § 4.2.		

4.2. Etude des substances humiques.

4.2.1. Extraction.

Les substances humiques (SH) sont isolées de l'eau d'élevage en suivant la méthode mise au point par Takeda et Kiyono (1990). L'échantillon est filtré à $0,45 \mu\text{m}$ sur filtre Millipore puis passé ensuite, à $240 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$, sur une première colonne ($2,5\times 60 \text{ cm}$) contenant une résine échangeuse de cations, en copolymères de styrène divinylbenzene greffée Fe^{3+} (Bio-rad Chelex 100). Cette résine est capable de fixer les substances que nous recherchons, en formant des liaisons chélates entre les ions Fe^{3+} et les fonctions acides des substances présentes dans l'eau. La colonne est rincée à l'eau distillée et les substances retenues sont éluées en passant une solution d'ammoniaque 3 M. Afin d'éliminer les ions Fe^{3+} et les autres ions métalliques, l'éluat est passé dans une seconde colonne ($5\times 20 \text{ cm}$) du même type que la première mais greffée NH_4^+ (résine Chelex 100 Bio-rad). Cette résine greffée NH_4^+ est obtenue par conversion d'une résine greffée Na^+ par passage d'une solution de sulfate d'ammonium 3 M.

L'ammoniaque et le solvant sont éliminés par évaporation dans un évaporateur rotatif jusqu'à l'obtention d'un extrait sec. La poudre ainsi obtenue est ensuite diluée dans un volume d'eau distillée de façon à obtenir une solution ayant une concentration connue.

Le rendement d'extraction (Rdt) de la colonne Chelex 100 greffée Fe^{3+} sera évalué en comparant l'absorbance de la solution échantillon avant (Abs_0) et après (Abs_1) passage sur cette colonne. L'absorbance due aux nitrates (Abs_{NO_3}) sera prise en compte.

4.2.2. Evaluation de la masse molaire (MM).

Afin de séparer les différentes molécules de la solution obtenue après extraction et de déterminer la MM de ces substances, nous réalisons une chromatographie d'exclusion. La chromatographie est réalisée en utilisant un gel de polyacrylamide (BIO GEL-P2, Bio-rad) qui sépare les molécules de MM comprises entre 100 et $1800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. La phase mobile utilisée est un tampon phosphate ($0,02 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) dont le pH est ajusté à 8 et qui contient de l'azide de sodium à 0,02% comme antimicrobien. La colonne mesure $1,5\times 84 \text{ cm}$ et le débit de passage est $6 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$. Pour étalonner la colonne, nous avons sélectionné des étalons dont la composition chimique et la forme stérique se rapprochent le plus de la molécule étudiée. Le tableau n°2.5. présente les différents étalons, leur MM et la longueur d'onde à laquelle ils

seront détectés en spectrophotométrie d'absorbance. Le détecteur en sortie de colonne est un spectrophotomètre Beckmann DU 600. L'échantillon est récupéré en sortie de colonne par fractions de 1 ml sur lesquelles sont réalisées les spectres d'absorption complets afin de confirmer les détections à longueur d'onde fixe. L'Acide Humique (Aldrich) est aussi passé comme échantillon : sa détection est réalisée à 300 nm.

Tableau n°2.5. Caractéristiques des étalons.

Molécule	Masse molaire (g·mol ⁻¹)	Longueur d'onde utilisée pour la détection (nm)
Sérum albumine	65000 (masse moléculaire d'exclusion)	280
Vitamine B12	1355	280
Nystatine	941	300
Acide Fusidique	538	250

L'annexe n°2.2. présente les caractéristiques de la courbe d'étalonnage obtenue sur la colonne d'exclusion.

4.2.3. Caractéristiques optiques.

Les nitrates et les nitrites présents en solution absorbent vers 300 nm puis dans l'UV profond. Une courbe d'étalonnage permet, en connaissant leurs concentrations, d'estimer leurs absorbances à 300 nm (annexe n°2.3.). Les concentrations en nitrites rencontrées sont toujours faibles. En revanche, les nitrates absorbent de façon importante.

Les spectres en fluorescence sont réalisés sur un spectrofluorimètre Amicon SPF 500. Les différentes mesures ont été faites dans les mêmes conditions de réglage, en absorbance relative. Le témoin est obtenu sur l'eau distillée.

4.2.4. Analyse élémentaire des SH.

La composition élémentaire d'un extrait sec de SH a été recherché pour les éléments CHON et S. Les analyses ont été effectuée par le laboratoire d'analyse du CNRS (Service Central d'Analyse) sur un extrait sec de SH. Le tableau n°2.6. décrit les méthodes utilisées.

Tableau n°2.6. Méthodes de mesure des éléments C,H,O,N et S.

Élément	Combustion	Dosage
Carbone	1050 °C sous flux d'oxygène	CO ₂ par spectrométrie infrarouge ou coulométrie
Hydrogène	1050°C sous flux d'oxygène	H ₂ O par infrarouge ou coulométrie
Azote	1050°C puis réduction des oxydes d'azote	N ₂ par catharométrie
Oxygène	Pyrolyse à 1080°C puis passage sur charbon actif à 1120°C	CO par spectrométrie infrarouge
Soufre	1320°C	SO ₂ par coulométrie

5. L'ANALYSE STATISTIQUE.

Pour comparer les données, des tests d'analyse de variance à un facteur ont été réalisés. Pour les études bactériologiques, une transformation logarithmique a été réalisée, quand les variances n'étaient pas homogènes et/ou quand les résidus n'avaient pas une répartition normale. Le test de Newmann-Keuls a été utilisé pour l'étude des groupes homogènes.

Les relations entre les différents paramètres mesurés et la fermeture du circuit sont obtenues par régression linéaire, après analyse de variance et si nécessaire transformation logarithmique.

6. LES OUTILS INFORMATIQUES UTILISES POUR LA MODELISATION.

Trois logiciels ont été utilisés pour établir ce modèle:

- le premier utilisé s'appelle **Stella** (*Systemes Thinking, Experiential Learning Laboratory, with Animation*), édité par High performance systems. C'est un logiciel spécialisé dans la simulation de systèmes dynamiques. Ce logiciel, d'un abord très simple, permet à l'aide de symboles de définir des compartiments entre lesquels circulent des flux. Les relations entre les compartiments (représentées par des boîtes) sont symbolisées par des tuyaux. La partie mathématique d'intégration des équations différentielles est faite automatiquement sans l'intervention du modélisateur, si ce n'est pour définir la méthode d'intégration ou le pas de temps. Ce logiciel a pourtant deux inconvénients essentiels : il est limité en nombre de pas de temps d'intégration (dans notre cas la durée de modélisation ne pouvait pas dépassé 300 heures) et il n'est pas

capable d'ajuster un paramètre par rapport à des données observées. Dans la pratique, cette dernière propriété impose un calibrage paramètre par paramètre. L'ajustement doit se faire par ailleurs, en comparant par régression linéaire les données estimées avec la valeur choisie du paramètre et les valeurs observées (Mesplé, 1993). Dans notre cas, un grand nombre de paramètres sont liés, ce qui impose de les calibrer en même temps. Le calibrage est donc quasiment impossible en utilisant ce logiciel.

- De façon à résoudre ce problème de temps de simulations et de calibration, nous sommes passés à un autre logiciel: SENECA (Simulation ENvironment for EColgical Application) développé par le Netherland Institute for Ecology Centre for Estuarine and Coastal Ecology. Ce logiciel, moins convivial que Stella, est développé sous environnement DOS et se programme en langage informatique FORTRAN. Toutefois, sa programmation est plus rapide que sur Stella, où la programmation graphique est laborieuse à réaliser (elle permet quand même de mieux visualiser les phénomènes). SENECA a l'énorme avantage de pouvoir calibrer plusieurs paramètres en même temps et d'estimer la qualité de l'ajustement entre variable observées et simulées, par le calcul d'un coefficient : le GoF (Goodness of Fit). Toutefois, lors de la phase de calibration le logiciel est limitée à 999999 pas de temps d'intégration.

- Parallèlement, nous avons utilisé le logiciel LABVIEW, développé par la National Instrument. Ce logiciel de programmation graphique (en langage G) a, comparativement aux deux autres logiciels présentés précédemment, des possibilités et des champs d'application beaucoup plus vastes. Il permet notamment de piloter les systèmes en continu et il n'est pas limité en nombre de pas de temps d'intégration... En revanche, il est peu pré-programmé, notamment au niveau du traitement statistique des données, ce qui rend difficile son utilisation pour calibrer plusieurs paramètres en même temps.

CHAPITRE 3.
LES SUBSTANCES D'ACCUMULATION DANS LES CIRCUITS FERMES
PISCICOLES.

Le circuit fermé est basé sur des traitements biologiques et mécaniques de l'eau qui permettent de diminuer les apports d'eau neuve. La première conséquence de la diminution des apports d'eau est l'accumulation dans le milieu d'élevage de composés chimiques divers : carbone, azote et phosphore essentiellement. Ces composés sont les nitrates pour le cycle de l'azote, les phosphates pour le cycle du phosphore et devraient être le dioxyde de carbone (CO_2) pour le cycle du carbone. Le CO_2 étant éliminé par dégazage : il ne devrait donc théoriquement pas y avoir d'accumulation de carbone dans les eaux du circuit. La présence de carbone organique dissous (COD) et de substances humiques (SH) a déjà été décrite en aquariophilie (Hirayama et *al.*, 1988 et Takeda et Kyiono, 1990). Il pourrait donc y avoir accumulation de COD, pouvant alors servir de source de carbone pour les bactéries hétérotrophes du circuit. Le carbone se trouve aussi sous forme particulaire, qui s'accumule dans le filtre biologique d'où il est partiellement éliminé lors des lavages. Les études ayant permis de décrire l'évolutions des populations bactériennes aquatiques prennent en compte le substrat dissous (Gagnon et *al.*, 1997).

Ce chapitre a pour objectif de décrire, caractériser et quantifier les formes d'accumulation des nutriments (N, P et C) dans les eaux d'élevage. La première partie sera consacrée à la mise en évidence de la présence de SH dans les piscicultures en circuit fermé. La seconde partie s'attachera à décrire en fonction de la fermeture du circuit l'accumulation des différents composés : nitrates, phosphates, COD et SH.¹

1. CARACTERISATION DES SUBSTANCES HUMIQUES.

La mise en évidence puis la caractérisation des substances humiques (SH) ont été réalisées sur le circuit pilote de 24 m³. Les apports d'eau neuve ont été réduits à 1 m³ par kg d'aliment distribué. Nous avons réalisé un prélèvement de 1500 ml d'eau d'élevage en sortie de filtre biologique et extrait les SH en suivant la méthode mise au point par Takeda et Kiyono (1990). Les concentrations en SH sont évaluées par absorbance à 300 nm. A ces degrés de fermeture, la concentration en nitrates est de 40 mg·l⁻¹. Or les nitrates (et même les nitrites, mais nous n'en avons quasiment pas) absorbent eux aussi entre 350 et 200 nm, avec un pic à 300 nm. Les concentrations en SH sont évaluées à partir de l'absorbance totale de l'échantillon à 300 nm à laquelle est soustraite l'absorbance due aux nitrates. L'extraction se fait sur une colonne chélatante (Chelex 100 greffée Fe^{3+}) en deux étapes distinctes : la fixation des SH sur la colonne, puis leur récupération. Le rendement complet de l'extraction est

¹ Ce travail fait l'objet d'une publication présentée dans l'annexe n°3.1.

obtenu en faisant le produit du rendement de chacune des deux phases. Il sera calculé par comparaison aux mesures en absorbance (les nitrates étant pris en compte).

Le rendement de fixation (Rdt) sur la colonne d'extraction est évalué en comparant l'absorbance de la solution échantillon avant (Abs_0) et après (Abs_1) passage sur cette colonne, l'absorbance due aux nitrates (Abs_{NO_3}) étant prise en compte. Le rendement de fixation est donc:

$$Rdt = (Abs_0 - Abs_1) / (Abs_0 - Abs_{NO_3}) \times 100 \text{ en } \%$$

On suit le rendement (Rdt') de la phase de récupération des substances en mesurant l'absorbance à 300 nm de la solution de rinçage (Abs_2). On compare la quantité de SH récupérées (Q_{SH} récupérée) dans le volume d'éluion (Ve) (Q_{SH} récupérée = $Ve \cdot Abs_2$) à celle de 1500 ml d'échantillon (Q_{SH} fixée = $1500 \cdot (Abs_0 - Abs_1)$). Le rendement de récupération est calculé de la manière suivante:

$$Rdt' = 100 \cdot Q_{SH} \text{ récupérées} / Q_{SH} \text{ fixées} \text{ en } \%$$

1.1. Rendement d'extraction.

Le tableau n°3.1. présente les propriétés optiques du prélèvement avant et après passage sur la colonne d'extraction des SH. L'annexe n°3.1. contient les caractéristiques de l'eau d'élevage lors du prélèvement.

Tableau n°3.1. Absorbance de l'échantillon avant et après passage sur la colonne greffée Fe^{3+} .

Absorbance à 300nm	de la solution brute	due aux nitrates (Abs_{NO_3})	due aux substances humiques
Avant extraction	0,09	0,01907	0,073 (Abs_0)
Après extraction	0,0364	0,01907	0,0167 (Abs_1)

Le rendement d'extraction Rdt s'exprime donc de la façon suivante :

$$Rdt = (Abs_0 - Abs_1) / (Abs_0 - Abs_{NO_3}) \times 100 \text{ en } \%$$

$$\text{Soit } Rdt = 100 \times (0,073 - 0,0167) / 0,073$$

$$\mathbf{Rdt = 77,7\%}$$

Les substances humiques fixées sur la résine sont récupérées en rinçant la colonne avec une solution d'ammoniaque 3M. Après passage de 150 ml de solution, l'absorbance en

sortie de colonne est nulle. Le tableau n°3.2. présente l'absorbance de l'échantillon et de la solution éluante.

Tableau n°3.2. Absorbances mesurées lors de la phase de récupération des SH.

	Volume (ml)	Absorbance à 300 nm due aux SH	Quantité de SH
Etape de fixation des SH sur la colonne	1500	0,0563	$Q_{SH \text{ fixées}} =$ $1500 \times 0,0563 = 84,45$
Etape de récupération des SH fixées sur la colonne	150	0,58	$Q_{SH \text{ récupérées}} =$ $150 \times 0,58 = 87$

Le rendement de récupération Rdt' s'exprime donc de la façon suivante :

$$Rdt' = 100 \cdot Q_{SH \text{ fixées}} / Q_{SH \text{ récupérées}} \quad \text{en \%}$$

soit $Rdt' = 100 \cdot (87/84,45)$

$$\mathbf{Rdt' = 103,1\%}$$

Le rendement de récupération est égal à 100%, il y a en effet y avoir une imprécision sur la mesure la plus basse (0.0563 ± 0.001). La totalité des substances humiques fixées par la colonne a donc été récupérée.

Le rendement d'extraction global est donc de 77,7%.

Après évaporation nous avons obtenu 122 mg d'une poudre brun-jaune (pour les 1500 ml prélevés), correspondant à une concentration de $81,3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ dans les eaux d'élevage. Cet extrait est dissous dans l'eau distillée de façon à obtenir une solution reconstituée de substances humiques.

1.2. Propriétés optiques.

Le tableau n°3.3. présente les propriétés optiques du prélèvement brut et de la solution reconstituée de SH.

Tableau n°3.3. Propriétés optiques des substances humiques.

Propriétés optiques	Prélèvement brut (81,4 mg·l ⁻¹ de SH)	Solution SH (122 mg·l ⁻¹ de SH)
Spectre d'absorbance (nm)	Spectre continu en augmentation de 400 à 200, maximum à 300 (nitrates)	Spectre continu absorbance en augmentation de 400 à 200 (fig. n°3.1.)
Longueur d'onde maximale émission en fluorescence λ_{em} (nm)	470	470
Longueur d'onde maximale d'excitation en fluorescence λ_{exc} (nm)	370	370
Fluorescence relative* pour λ_{exc} et λ_{em} maximum	3,21	3,66

*rapport de la fluorescence de l'échantillon et du témoin (eau de mer reconstituée et eau distillée).

Remarque :

La salinité de la solution reconstituée est très faible (<0,1 %) alors que les solutions brutes d'eau d'élevage ont une salinité de 3,4 %. Il se peut que les ions présents en solution, et plus particulièrement les ions Cl⁻, perturbent la mesure et diminuent la fluorescence des solutions salées.

Le ratio d'extraction peut être recalculé par mesure de la fluorescence ($\lambda_{exc} = 370$ nm et $\lambda_{em} = 470$ nm) de la solution brute et de la solution reconstituée de SH (tableau n°3.3.). On obtient alors un rendement d'extraction de 76 %, ce qui confirme donc le rendement calculé précédemment (77,7 %).

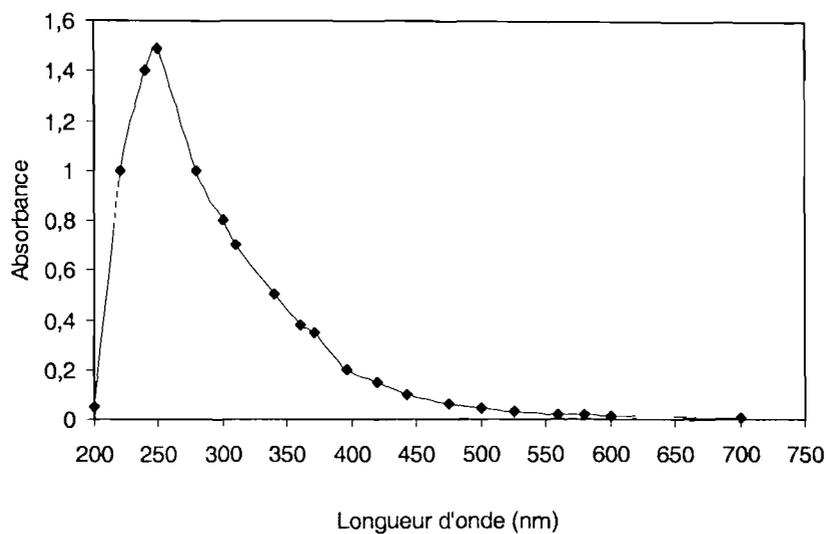


Figure n°3.1. Spectre d'absorbance d'une solution reconstituée de substances humiques ($12 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

1.3. Chromatographie d'exclusion.

La figure n°3.2. présente le profil d'absorbance obtenu au cours du passage de l'extrait de SH à travers la colonne d'exclusion.

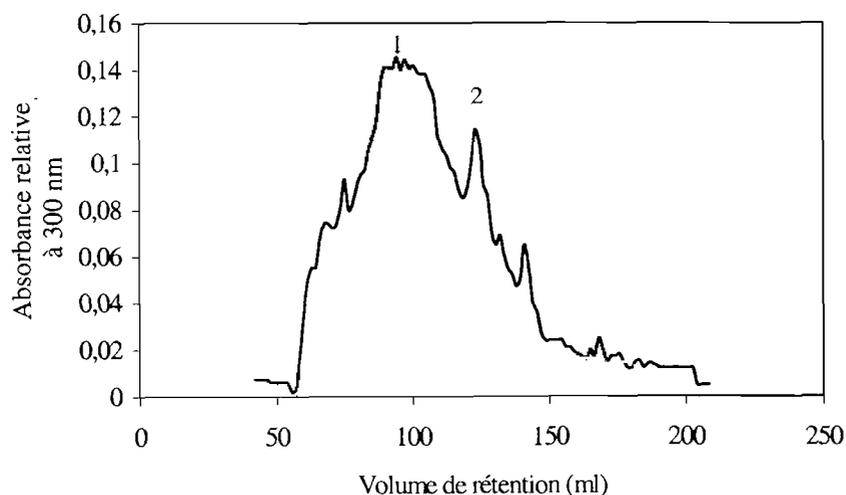


Figure n°3.2. Chromatogramme d'exclusion des SH.

Le chromatogramme montre qu'il existe un pic principal (1) et quelques pics secondaires qui pourraient correspondre à des artefacts. Nous avons retenu deux pics : le pic principal (1) qui correspond à deux ou trois types de molécules, dont les masses molaires sont

distribuées autour de $1200 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, et le pic (2) qui correspond à une molécule dont la masse molaire est $900 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Le tableau n°3.4. présente les volumes d'élution et les poids moléculaires correspondants aux SH isolées et ceux de l'acide humique Aldrich (témoin).

Tableau n°3.4. Volumes d'élution et masses molaires des substances humiques et de l'acide humique "Aldrich".

Substances	Volume d'élution (ml)	Masse moléculaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
pic 1	100	1221
pic 2	130	914
Acide humique Aldrich	90	1345

1.4. Analyse élémentaire des SH.

La composition élémentaire des SH est : 55% de carbone, 8,5% d'hydrogène, 18,5% d'azote, 18% d'oxygène ; A noter l'absence de soufre. Ceci correspond à des ratios atomiques de : 1,8 H/C; 0,28 N/C et 0,25 O/C.

1.5. Correspondance entre carbone organique dissous et absorbance à 300 nm due aux substances humiques.

L'étude de l'absorbance à 300 nm (1,667 : absorbance relative) et de la concentration en carbone organique dissous (COD) ($196 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) de la solution reconstituée de SH montre qu'à une unité d'absorbance correspond une concentration de $127 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de COD (sous la forme de SH).

2. CARACTERISATION CHIMIQUE DES EAUX D'ELEVAGE EN CIRCUIT FERME PISCICOLE.

Ces expériences ont été réalisées sur les deux circuits parfaitement identiques de 6 m^3 , pendant plus de 6 mois en tout (période transitoire et quatre mois de régime stationnaire). Les apports d'eau ont été calculés par rapport à la prise alimentaire de poissons de façon à stabiliser, semaine par semaine, un ratio ingéré sur eau neuve R donné. Les prélèvements pour les analyses de chimie sont effectués à la fin de chaque semaine, à la sortie du filtre

biologique. Ils correspondent à des états d'équilibre des circuits. Les analyses suivantes sont alors effectuées : les trois formes d'azote minéral (N-NH₃, N-NO₂, N-NO₃), les phosphates, le COD et les substances humiques.

2.1. L'accumulation d'azote minéral.

La figure n°3.3. montre qu'il existe une relation linéaire entre R et la concentration en azote totale (AT).

$$AT = 40,6 \cdot R + 6,99 \quad (r^2 = 0,97) \quad (9)$$

La pente de cette droite représente la quantité d'azote libéré dans le circuit par kg d'aliment distribué. Elle correspond à $40,6 \pm 2,8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Les concentrations en ammoniacque et en nitrites sont restées respectivement inférieures à $0,6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ et $0,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. L'ammoniacque et les nitrites représentent donc moins de 2 % de l'azote total qui est constitué essentiellement de nitrates.

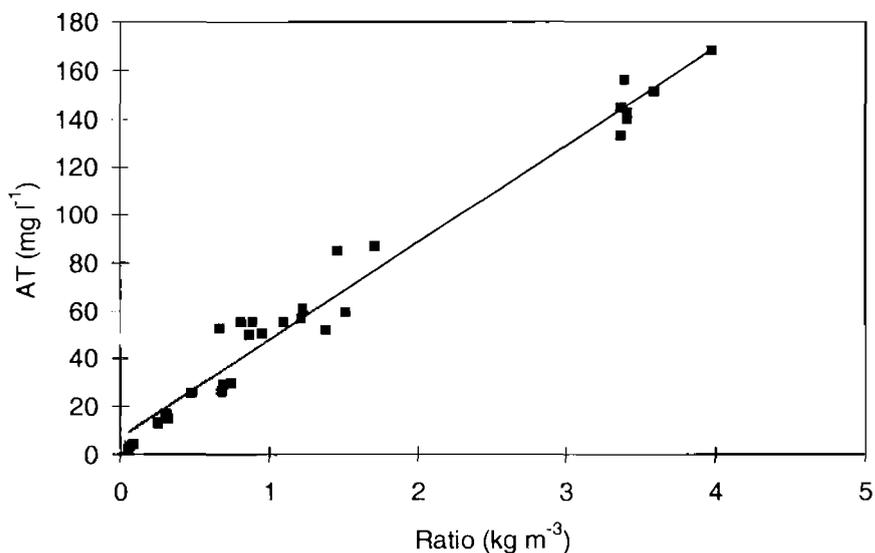


Figure n°3.3. Concentrations en azote total en fonction du ratio R.

2.2. L'accumulation des phosphates.

La figure n°3.4. montre qu'il existe une relation de type logarithmique entre R et la concentration en phosphore inorganique dissous ($P-PO_4^{3-}$).

$$PO_4^{3-} = 1 \cdot \ln(R) + 2,82 \quad (r^2 = 0,818) \quad (10)$$

La quantité de phosphates retrouvées dans le circuit par kg d'aliment distribué est donc de $1g \cdot kg^{-1}$. Cette quantité a tendance à diminuer quand on diminue le renouvellement en eau du circuit.

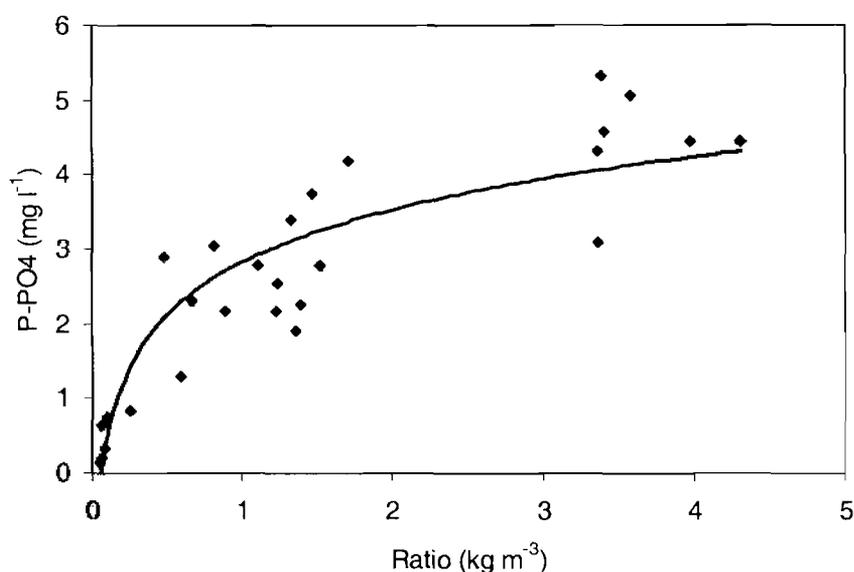


Figure n°3.4. Concentration en phosphates en fonction du ratio R.

2.3. L'accumulation du carbone organique dissous et des substances humiques.

2.3.1. Le carbone organique dissous (COD).

La figure n°3.5. montre qu'il existe une relation de type logarithmique entre R et le COD.

$$COD = 2,62 \cdot \ln(R) + 9,69 \quad (r^2 = 0,75) \quad (11)$$

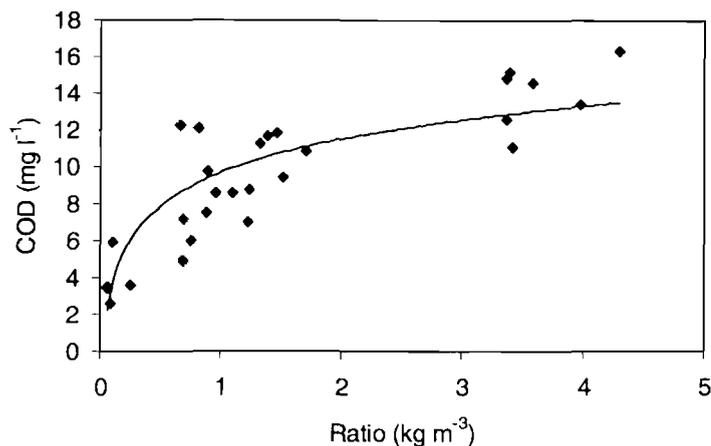


Figure n°3.5. Concentration en carbone organique dissous en fonction du ratio R.

2.3.2. Les substances humiques (SH).

La figure n°3.6. montre qu'il existe une relation linéaire entre le ratio ingéré sur eau neuve R et l'absorbance à 300 nm liée aux SH.

$$SH = 0,026 \cdot R + 0,016 \quad (r^2 = 0,93) \quad (12)$$

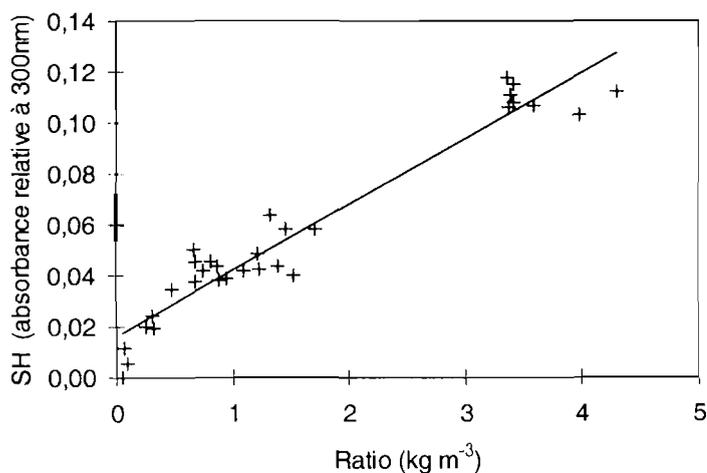


Figure n°3.6. Absorbance due aux substances humiques en fonction du ratio R.

Si on exprime les SH en $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de COD (Chapitre 3., § 1.5.), on obtient la part des SH dans le COD total en fonction du ratio R (fig. n°3.7.).

$$\text{HS/COD} = 0,103 \cdot R + 0,50 \quad (r^2 = 0,65) \quad (13)$$

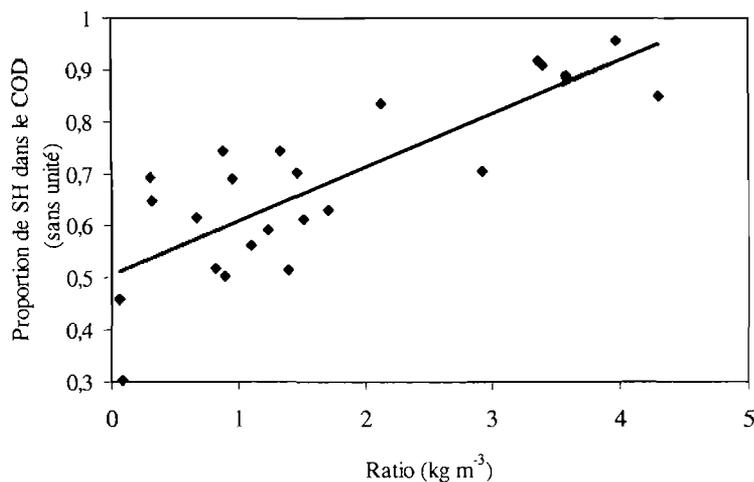


Figure n°3.7. Proportion des SH dans le COD en fonction du ratio R.

Les SH représentent donc entre 5 % et 50 % du COD, en fonction de la fermeture du circuit. Plus les apports d'eau neuve sont faibles, plus le COD s'accumule sous forme de SH.

L'annexe n°3.2. présente les caractéristiques des relations entre R, $\ln(R)$ et les différents paramètres suivis.

3. DISCUSSION.

3.1. Le carbone organique dissous.

La concentration en COD est corrélée au ratio ingéré sur eau neuve par une fonction de type logarithmique (Fig. n°3.5.). C'est à dire que la quantité de carbone libérée par kg d'aliment ingéré diminue quand on ferme le circuit. La quantité de carbone contenue dans l'aliment étant de 400g par kg d'aliment brut, le pourcentage de COD retrouvé est de 1,5 % pour un circuit relativement ouvert (R inférieur à $0,5 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$) et de l'ordre de 0,75 % pour un

circuit très fermé (R supérieur à $3 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$). Si on extrapole les valeurs mesurées par Hall et *al.*, (1990) chez la Truite Arc-en-Ciel, le carbone ingéré se répartit de la façon suivante :

- 22 % est stocké par les poissons;
- 55 % se retrouve sous forme dissoute dans les eaux d'élevage, essentiellement du CO_2 puisque seulement 1 % du C ingéré est retrouvé sous forme de COD;
- 23 % se retrouve sous forme particulaire dans les fèces.

Hirayama et *al.*, (1988) mesure $16 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de COD dans des aquariums où le ratio ingéré sur eau neuve est de $2 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, alors que nous avons mesuré $11 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de COD à ce même ratio. L'ordre de grandeur est le même, et l'écart est probablement dû à la gestion de la filtration mécanique puisque dans nos expériences, le filtre est lavé tous les jours alors que chez eux, il n'a pas été lavé durant toute l'expérience. On peut aussi remarquer que dans leur expérimentation, la filtration mécanique est réalisée par le filtre biologique qui piège les matières en suspension (MES).

Les substances humiques sont produites par auto-oxydation des acides gras poly-insaturés présents dans l'eau (Harvey et *al.*, 1983). Dans nos circuits, il existe plusieurs sources possibles d'acides gras : les fèces des poissons, les granulés non ingérés avant qu'ils ne soient récupérés par le piège à particules et la lyse bactérienne. La comparaison des quantités de SH mesurées pour différents systèmes ou environnements est rendue difficile par la diversité des méthodes de mesure ou d'analyse employées (chapitre 1., tableau n°1.1.). Ces méthodes sont souvent relatives, basées sur l'absorbance ou la fluorescence, mais à des longueurs d'onde variables d'un auteur à l'autre. Les maxima d'excitation et d'émission (370 nm et 470 nm respectivement), ainsi que le maximum d'absorbance dans l'UV profond sont en concordance avec les caractéristiques données dans la littérature pour les substances humiques, en particulier celles isolées en aquaculture eau douce et eau de mer par Hirayama et *al.*, (1988) et Takeda et Kiyono (1990). La masse molaire $1200 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ est de l'ordre de grandeur des SH décrites par Harvey (1983). En ce qui concerne les ratios atomiques, la comparaison de ceux que nous avons trouvés avec ceux rapportés par Ishiwatari (1992), montre que le pourcentage de carbone est du même ordre de grandeur. En revanche, les ratios H/C et N/C sont élevés, ce qui montre que les SH isolées dans nos circuits contiennent une plus grande proportion d'azote que les autres.

La quantité de SH augmente dans les eaux d'élevage au prorata de la diminution des apports d'eau (fig. n°3.5.). La part des SH dans le COD total augmente (fig. n°3.6.) quand on diminue les apports d'eau, ce qui montre que les SH constituent la forme d'accumulation du carbone dissous dans le circuit, tout comme les nitrates le sont pour le cycle de l'azote. Cette

observation est en accord avec Ogura (1977) et Corin et *al.*, (1998), selon lesquels les SH ne sont pas biodégradables par les microorganismes dans un milieu qui contient des molécules carbonées plus petites et plus facilement assimilables. Van der Kooij et *al.*, (1982) et Servais et *al.*, (1987) ont mesuré différents pourcentages de carbone organique dissous biodégradable (CODB) en fonction de la qualité des eaux : respectivement 2 et 10 % pour les lacs et les eaux de mer ; 27 et 60 % pour les eaux polluées. Les valeurs mesurées par Van der Kooij et *al.*, sont plus faibles car sa méthode sous estime la biodégradabilité (Chapitre 1., § 4.3.3.). Des pourcentages de biodégradabilité que nous avons observées (entre 5 et 50 %) montrent que la qualité des eaux évolue en fonction des apports d'eau neuve et que les eaux des élevages les plus fermés contiennent peu de substances nutritives pour les micro-organismes en place.

Le CODB est égal au COD auquel les SH (exprimées en $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de C) sont soustraites (équation 14).

$$\text{CODB} = \text{COD} \cdot (1 - \text{HS}/\text{COD}) \quad (14)$$

La combinaison des équations (10) et (12) (voir § 2.3.) permet de calculer la quantité de COD biodégradable (CODB) pour chaque ratio ingéré sur eau neuve.

$$\text{COD} = 2,62 \cdot \ln(R) + 9,69 \quad (r^2 = 0,75) \quad (11)$$

$$\text{HS}/\text{COD} = 0,103 \cdot R + 0,50 \quad (r^2 = 0,65) \quad (13)$$

L'équation (14) permet alors d'obtenir une expression du CODB (équation 15).

$$\text{CODB} = 1,31 \cdot \ln(R) - 0,269 \cdot R \cdot \ln(R) - 0,99 \cdot R + 4,845 \quad (15)$$

La figure n°3.8. représente l'évolution de CODB en fonction de R obtenue à partir de l'équation 15, R variant entre 0 et 3,5. On observe que la quantité de CODB passe par un maximum quand R est égal à $1 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. En effet la majeure partie du COD est sous forme de SH. Une fermeture du circuit au delà $1 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, ne s'accompagne pas d'une augmentation de la quantité de carbone disponible dans le circuit.

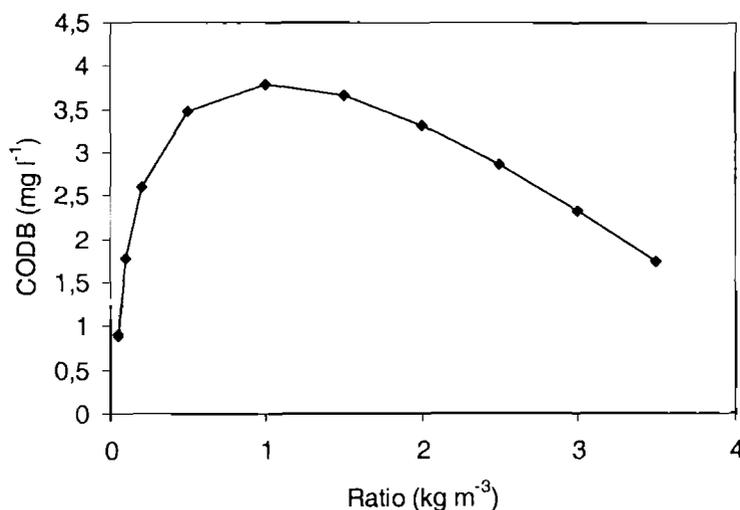


Figure 3.8 : Evolution du CODB en fonction de R.

3.2. L'azote minéral.

La concentration en nitrates (forme essentielle de l'azote dans les circuits) dans les eaux d'élevage est corrélée linéairement au ratio ingéré sur eau neuve, ce qui montre que la quantité d'azote que l'on retrouve après chaque kg d'aliment distribué est constante et égale à 40,6 g d'azote par kg d'aliment. Cette quantité d'azote correspond à 73 % de l'azote contenue dans l'aliment. Pagand et *al.*, (2000) et Heinen et *al.*, (1996) sur des élevages en circuit recirculés respectivement de bar et de truites, observent que la quantité d'azote libérée par kg d'aliment ingéré diminue quand on ferme le circuit. Les expérimentations de Pagand et *al.*; ont été réalisées sur le circuit pilote de 24 m³ que nous avons utilisé. Ils trouvent que l'azote libéré par kg d'aliment varie entre 35 et 65 % quand les apports d'eau neuve passent de 35 à 200 % par jour. La quantité maximale d'azote libéré est inférieure de 7 % à la nôtre (73 %), ce qui suggère qu'il existe des pertes d'azote dans son expérience. Ce phénomène s'amplifie quand il diminue les apports d'eau neuve, pour atteindre 40 %. Deux hypothèses peuvent être émises : (1) qu'il existe dans le circuit des zones anaérobies où les bactéries dénitrifiantes transforment les nitrates en azote gazeux ; (2) que l'azote est fixé dans le filtre biologique, sous forme de bactéries ou de matières particulaires qui sont éliminées à chaque lavage du filtre biologique. Lemarié et *al.*, (1998) mesurent que 86 % de l'azote contenu dans l'aliment est libéré sous forme d'azote dissous (sous forme ammoniacale car le circuit piscicole est un système ouvert). Ces résultats, comparés aux nôtres montrent qu'il pourrait exister des

phénomènes de dénitrification ou de consommation de l'azote par les bactéries hétérotrophes dans nos circuits. Elles élimineraient environ 13 % (86 – 73) de l'azote. Pour Pagand et *al.*, (2000) et Heinen et *al.*, (1996), la fermeture du circuit provoque soit une augmentation des zones d'anaérobiose - ce qui est peu probable compte tenu des systèmes de régulation d'oxygène - soit une augmentation de la quantité de matière organique piégée dans le filtre biologique et éliminée lors des lavages.

3.3. Le Phosphore minéral.

La concentration en phosphates dans les eaux d'élevage est corrélée linéairement au ratio R (aliment ingéré sur eau neuve apportée au circuit), ce qui montre que la quantité de phosphore (sous forme de phosphates) que l'on retrouve après chaque kg d'aliment distribué est de 3 g pour des ratios inférieurs à 1 kg·m⁻³ et de 1 g pour des ratios de l'ordre de 3 kg·m⁻³. Cette quantité de phosphore correspond respectivement à 26 et 8,7 % des apports de phosphore de l'aliment. Pagand (1999), présente des suivis de phosphates (fig. 3.9.) réalisés sur le circuit pilote de 24 m³, à des ratios R variant entre 0,2 et 1,1 kg·m⁻³. Ces résultats montrent que dans ce circuit, la quantité de phosphates retrouvée dans les eaux est constante pour des ratios compris entre 0,2 et 1,1 kg·m⁻³, et égale à 5 g de phosphore (sous forme de phosphates) par kg d'aliment distribué. Ceci correspond à 43,5 % des apports de phosphore. Dans nos expériences, si nous ne considérons que les ratios R inférieurs à 1 kg·m⁻³ nous obtenons aussi une relation linéaire entre la concentration en phosphates et R, correspondant à une quantité de 3 g de phosphore par kg d'aliment (26 % des apports de phosphore).

L'excrétion phosphorée chez le bar se fait à 60 % sous forme dissoute et à 40 % sous forme particulaire (Lemarié et *al.*, 1998). En comparaison avec l'excrétion azoté, la forme dissoute est donc moins importante (86 % des rejets azotés sont des rejets dissous). De plus, le phosphore dissous peut précipiter sous forme de phosphate tricalcique dans des eaux au pH supérieur à 7,8 et riches en calcium : concentrations en Ca²⁺ supérieures à 40 mg·l⁻¹ (Mesplé, 1993). La concentration en calcium de l'eau de mer étant 400 mg·l⁻¹ (Sverdrup, 1963), à des pH supérieurs à 7,8, il est probable que nous ayons des précipités de phosphate tricalcique dans nos circuits.

Des différences existent, au niveau du traitement du particulaire et de la régulation du pH, entre le circuit pilote de 24 m³ et les circuits expérimentaux de 6 m³. Ces différences sont : (1) la filtration mécanique assurée dans le premier cas par un filtre autonettoyant et dans le second cas par des poches remplacées toutes les 24 h ; (2) le pH est stabilisé à

respectivement 7,2 et $7,8 \pm 0,2$. Les poches utilisées dans les circuits de 6 m^3 colmatent parfois, ce qui induit une filtration plus fine. Le spectre granulométrique des matières en suspension issues de fèces de bar (non publiée) comporte deux maxima, l'un autour de quelques microns et l'autre autour de $80\text{-}100 \mu\text{m}$. Compte tenu de la taille des pores des poches utilisées, il est peu probable que leur colmatage ait pour conséquence l'élimination d'une part significativement plus importantes des fèces. Les différences entre les deux systèmes de filtration n'expliquent donc pas les faibles teneurs en phosphates observées dans les circuits expérimentaux de 6 m^3 .

La régulation du pH est probablement la raison principale des différences observées :

- dans les circuits de 6 m^3 , la précipitation du phosphate tricalcique peut avoir lieu pour tous les ratios, puisque le pH est régulé autour de 7,8;

- les apports de soude se faisant à partir d'une solution saturée de soude, il existe ponctuellement au niveau de l'injection de la soude, une zone où le pH est très élevé. A cet endroit du circuit, on retrouve régulièrement des précipités composés vraisemblablement de carbonate de calcium et de phosphate tricalcique. L'importance de ces précipités est fonction des apports de soude.

Pour des ratios proche de $3 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, la concentration en phosphate approche $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ et les apports de soude (pour maintenir le pH) sont plus importants qu'à des ratios inférieurs, ce qui engendre une précipitation plus importante du phosphate tricalcique.

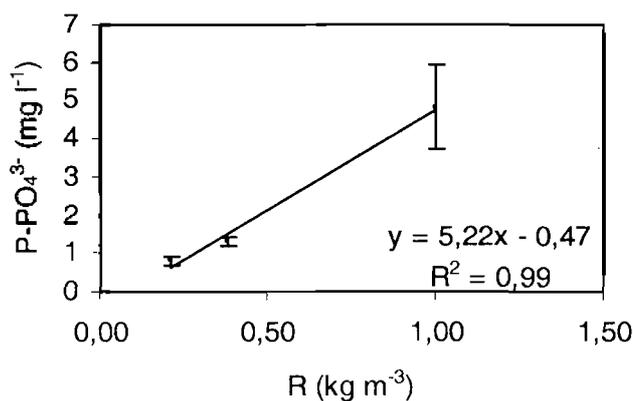


Figure n°3.9. Evolution des concentrations phosphates en fonction du ratio ingéré sur eau neuve, dans le pilote de 24 m^3 (obtenue à partir de Pagand, 1999).

4. CONCLUSION.

Les formes d'accumulation de l'azote, du phosphore et du carbone sont respectivement les nitrates, les phosphates et les substances humiques. Leur accumulation dans les eaux d'élevage est corrélée à la fermeture du circuit. Toutefois, la relation avec le ratio ingéré sur eau neuve n'est linéaire que pour les nitrates et les substances humiques. Pour le COD et les phosphates, leur accumulation est proportionnellement moins importante dans les circuits très fermés que dans les circuits plus ouverts. Ceci pourrait être dû à une utilisation de ces nutriments par les bactéries hétérotrophes et à la précipitation des phosphates. Nous allons donc maintenant étudier ces populations bactériennes hétérotrophes, afin de comprendre les relations qui existent entre bactéries et nutriments dans les circuits fermés piscicoles.

CHAPITRE 4. ETUDE DES POPULATIONS BACTERIENNES HETEROTROPHES

Les bactéries jouent un rôle épurateur fondamental dans les circuits fermés piscicole, notamment les bactéries autotrophes qui sont essentiellement responsables de la non-accumulation d'ammoniaque dans les circuits, l'ammoniaque étant le second paramètre létal après l'oxygène. Les bactéries hétérotrophes participent aussi à ce processus de nitrification, mais dans une moindre mesure. C'est en partie pour cela qu'elles ont peu été étudiées. Elles jouent cependant un rôle important, en consommant le carbone organique assimilable et en relarguant d'autres composés dans le milieu. De plus, toutes les bactéries pathogènes sont des bactéries hétérotrophes et les problèmes de bactérioses quand ils apparaissent sont toujours soignés de façon curative par antibiothérapie. L'objectif de cette étude est d'aborder le fonctionnement du "compartiment bactéries hétérotrophes", de nos circuits d'élevage, en étudiant leur nombre, leur type et la dynamique de ces populations.

L'étude du compartiment bactérien des circuits fermés a été effectuée en plusieurs étapes. La première a été réalisée sur le circuit pilote de 24 m³ (dont la capacité de production est de 2 tonnes de bars par an). Ce circuit est similaire aux circuits recirculés industriels, tant au niveau de sa conception que des charges élevées en poissons, de l'ordre de 80 à 100 kg·m⁻³. Sur cet outil, nous avons réalisé l'étude des populations bactériennes hétérotrophes présentes et évalué l'importance de chacun des compartiments du circuit fermé vis à vis de ces populations¹.

Par la suite, nous avons utilisé deux petits circuits d'élevage parfaitement identiques dévolus spécifiquement à notre étude. Ces circuits expérimentaux d'élevage sont basés sur les mêmes principes de fonctionnement que le circuit pilote de 24 m³, mais avec des charges d'élevage faibles (entre 5 et 10 kg·m⁻³ de bassin). Les travaux que nous y avons conduits ont pour objectif de comprendre la dynamique des populations bactériennes dans nos élevages et en particulier de rechercher les relations entre le COD et les bactéries hétérotrophes.

¹ Ce travail a fait l'objet d'une publication rapportée dans l'annexe n°4.1.

1. ÉTUDE DES BACTÉRIES HÉTÉROTROPHES DANS UN CIRCUIT FERME PISCICOLE.

Cette étude a été réalisée sur le circuit pilote de 24 m³. Les sites de prélèvements pour les bactéries libres sont l'entrée et la sortie de chaque compartiment du circuit : filtre biologique, bassin d'élevage, filtre mécanique, réacteur UV. Pour les bactéries fixées, nous avons effectué des prélèvements sur les parois du bassin, de la tuyauterie et sur le garnissage du filtre biologique. Des colonies issues de chacun de ces sites sont choisies au hasard parmi les différents types de colonies afin de caractériser leur genre. Les prélèvements sont réalisés tous les mois, de façon à pouvoir identifier les populations bactériennes au cours du temps.

1.1. Distribution spatiale: tendances générales.

Pendant les sept mois de mesure, où les apports d'eau neuve et de nourriture ont peu varié, le nombre de bactéries fixées dans le filtre biologique, les tuyaux et les parois des bassins est resté stable (fig. n°4.1.). Les dénombrements obtenus sur les tuyaux et les parois des bassins sont statistiquement comparables ($F_{5,3} = 0,179$, avec $p = 0,68$), de valeur respective : $1,1 \cdot 10^7 \pm 2,88 \cdot 10^6 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$ et $1,5 \cdot 10^7 \pm 1,09 \cdot 10^7 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$. Dans le filtre biologique, le nombre de bactéries fixées est de $7,3 \cdot 10^6 \pm 2,88 \cdot 10^6 \text{ UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ de garnissage.

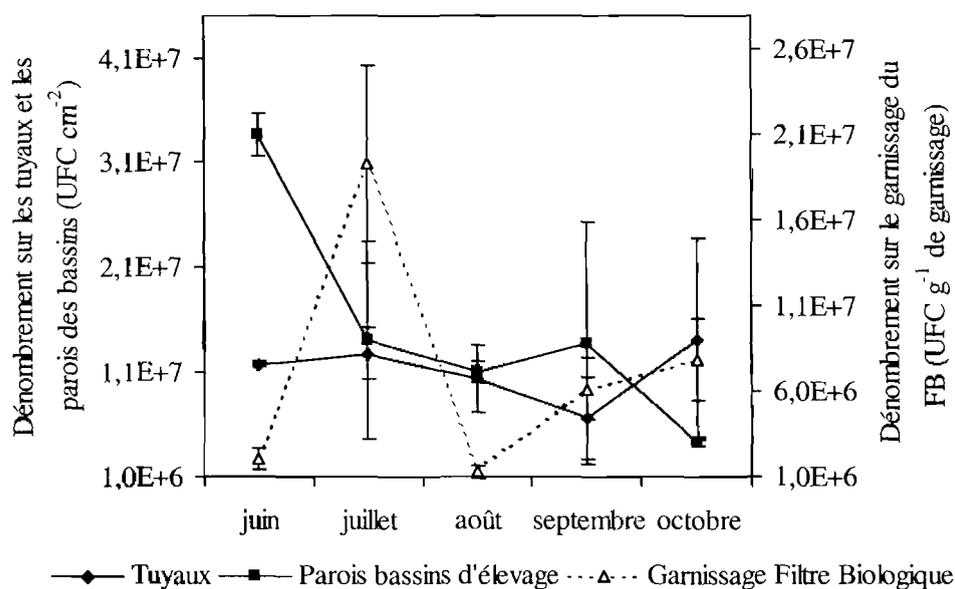


Figure n°4.1. Concentrations en bactéries fixées.

En ce qui concerne les bactéries libres, la figure n°4.2. montre que l'on peut distinguer 3 niveaux bactériens dans le circuit (test de Newmann-Keuls; $p < 0,05$ après analyse de variance $F_{2,62} = 16,39$; $p = 4,7 \cdot 10^{-7}$). Le nombre le plus faible est observé en sortie du réacteur UV (moins de $10^3 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$). Le niveau intermédiaire se trouve en entrée de filtre biologique, point de prélèvement situé à 20 mètres de canalisation (tuyaux en PVC) du réacteur UV, (plus de $10^3 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$). Le troisième niveau est observé entre la sortie du filtre biologique et l'entrée du réacteur UV (en passant par les bassins d'élevage). Dans cette section du circuit, la tendance générale est à l'augmentation du nombre de bactéries au fur et à mesure que l'on s'éloigne du filtre biologique. Les nombres ne sont cependant pas statistiquement différents. Par ailleurs, les nombres de bactéries en entrée et sortie de bassin ne sont également pas statistiquement différents, ce qui montre que le bassin d'élevage n'est pas un site privilégié de production de bactéries. En outre, l'augmentation du nombre de bactéries dans le bassin n'est pas corrélée à la biomasse de poissons ($R = -0,435$, $p = 0,242$) dans le bassin (fig. n°4.3.).

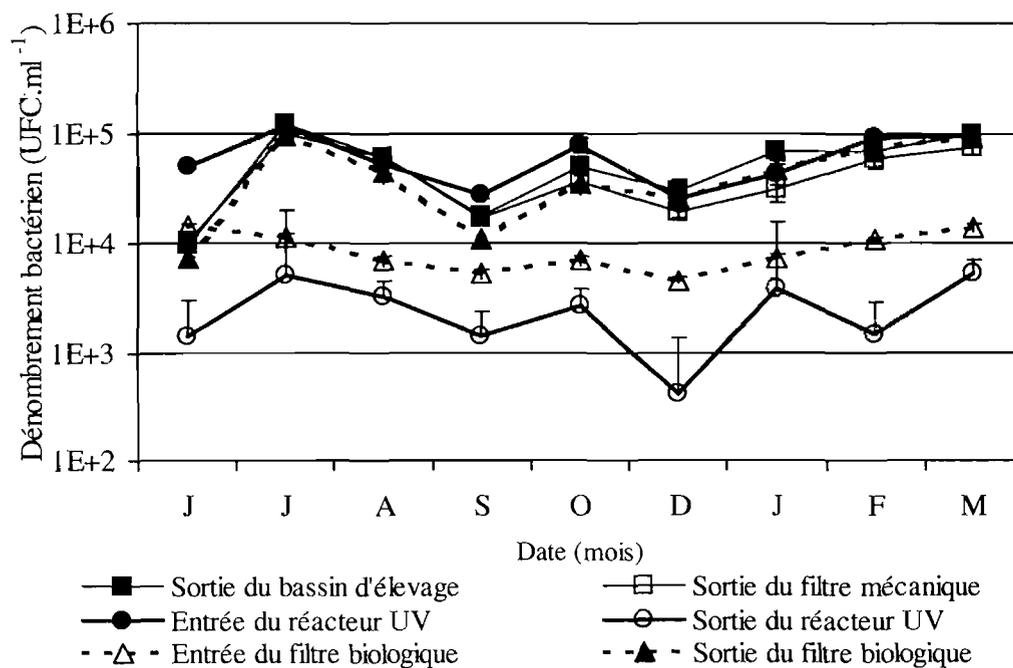


Figure n°4.2. Concentrations en bactéries circulantes dans les différents compartiments du système d'élevage.

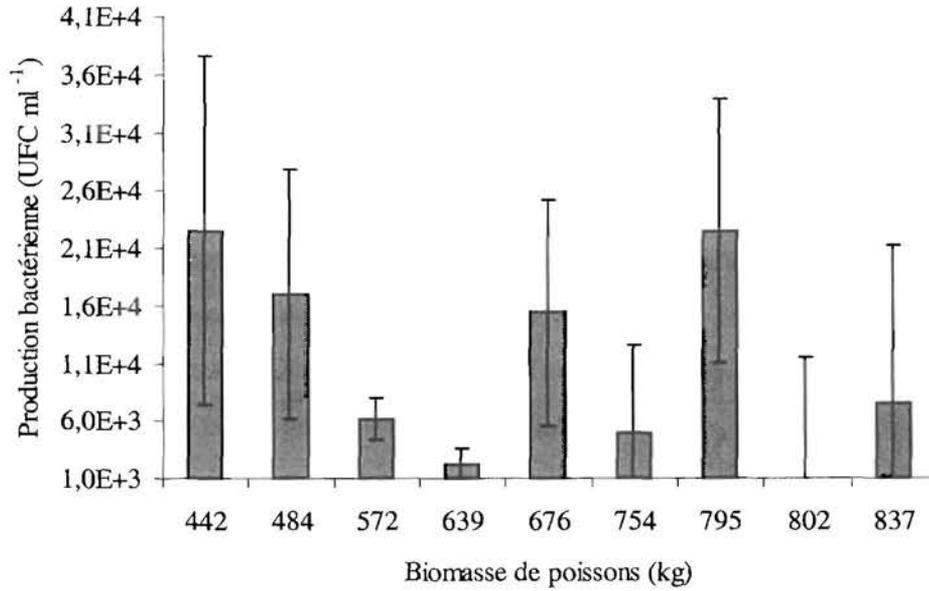


Figure n°4.3. Relation entre le nombre de bactéries produites dans le bassin et la biomasse de poissons en élevage.

De façon à mieux visualiser l'impact de chaque compartiment du circuit d'élevage sur les populations bactériennes hétérotrophes du circuit, la figure n°4.4. présente la différence entre le nombre de bactéries en entrée et en sortie de chacun d'eux (ces moyennes sont obtenues pour un ratio ingéré sur eau neuve de $0,38 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-1}$). Le filtre biologique est la source la plus importante de bactéries du circuit et que le réacteur UV élimine la majeure partie des bactéries produites, en réduisant la concentration en bactéries à $10^3 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ (soit 95 % d'abattement).

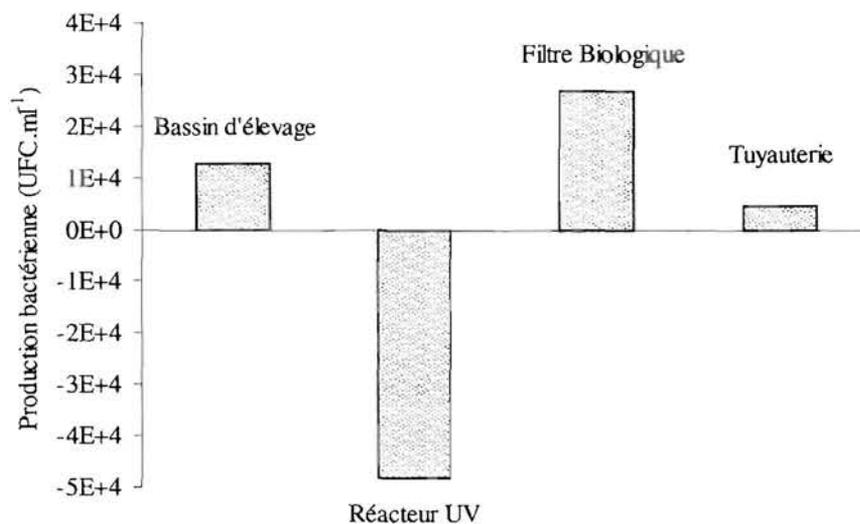


Figure n°4.4. Production ou élimination des bactéries dans les différents compartiments du système d'élevage.

1.2. Influence du taux de renouvellement en eau sur les bactéries hétérotrophes.

1.2.1. Essais sur le circuit pilote.

Les premiers essais ont été réalisés sur le circuit pilote de 24 m^3 , en même temps que la caractérisation des substances humiques dans les élevages piscicoles. Dans un premier temps, la quantité d'eau neuve a été augmentée de façon très importante (50 m^3 par jour), afin de commencer avec une eau d'élevage sans produit d'accumulation.

Pendant la durée de l'expérimentation, la quantité d'eau apportée au système a été fixée à 24, puis 50 et finalement 7 m^3 par jour (soit respectivement un ratio ingéré sur eau neuve de 0,38 ; 0,18 et $1,1 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$). Parallèlement l'indice de conversion alimentaire des poissons s'est dégradé passant de 1,8 à 11,2 alors que la quantité d'aliment distribué passait de 9 à 7 kg par jour. Le nombre de bactéries en sortie du filtre biologique a augmenté de $2,4 \pm 1,2 \cdot 10^4$ à $7,0 \pm 2,3 \cdot 10^4 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ (fig. n°4.5.; $F_{7,7} = 8,17$; $p = 0,045$), tandis que le nombre de bactéries fixées dans le filtre biologique augmentait de $5,1 \pm 3,43 \cdot 10^6$ à $1,1 \cdot 10^8 \pm 3,41 \cdot 10^7 \text{ UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ (Figure n°4.6.; $F_{7,7} = 30,23$, avec $p = 0,005$).

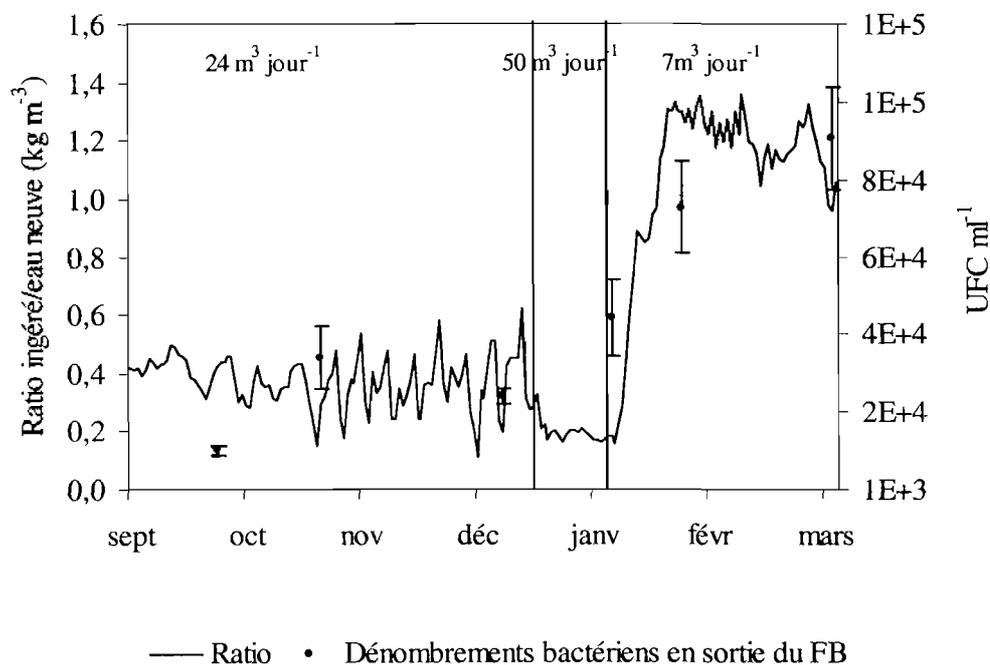


Figure 4.5. Nombre de bactéries en sortie de filtre biologique et Ratio ingéré sur eau neuve.

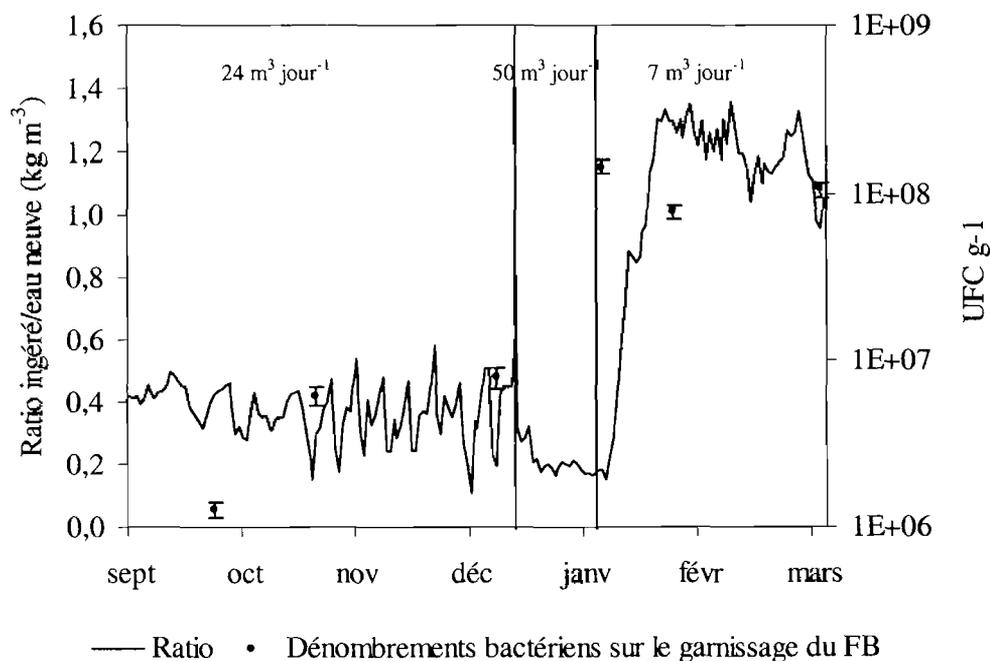


Figure 4.6. Nombre de bactéries fixées sur le garnissage du filtre biologique et Ratio ingéré sur eau neuve.

De façon de déterminer ce qui, du renouvellement en eau, de la quantité d'aliment ingéré ou de l'indice de conversion des poissons était responsable de l'augmentation du nombre de bactéries dans le circuit, nous avons réalisé des essais sur les petits circuits de 6 m³ en réduisant les apports d'eau neuve.

1.2.2. Influence des apports d'eau neuve sur le nombre de bactéries fixées et circulantes dans les élevages piscicoles.

Ces expériences ont été menées sur les deux circuits expérimentaux de 6 m³, en faisant varier les apports d'eau neuve de façon parfaitement contrôlée sur de longues périodes. Les prélèvements ont été réalisés en entrée et sortie du filtre biologique pour les bactéries libres et sur le garnissage du filtre biologique pour les bactéries fixées. Les prélèvements sont faits toutes les semaines, sur chacun des circuits, pendant 6 mois. Seuls les dénombrements correspondants à des états d'équilibre sont présentés. Le nombre de bactéries dénombrées est en sortie du filtre biologique de $3,29 \cdot 10^3 \pm 2,09 \cdot 10^3$ UFC·ml⁻¹ et sur le garnissage du filtre de $3,13 \cdot 10^5 \pm 2,6 \cdot 10^5$ UFC·g⁻¹ (fig. n°4.7.). Il n'y a pas d'augmentation du nombre de bactéries quand les apports d'eau neuve sont diminués (coefficient de corrélation entre R et le nombre

de bactéries en sortie de filtre biologique de 0,477 et coefficient de corrélation entre R et le nombre de bactéries dans le filtre biologique de $-0,12$).

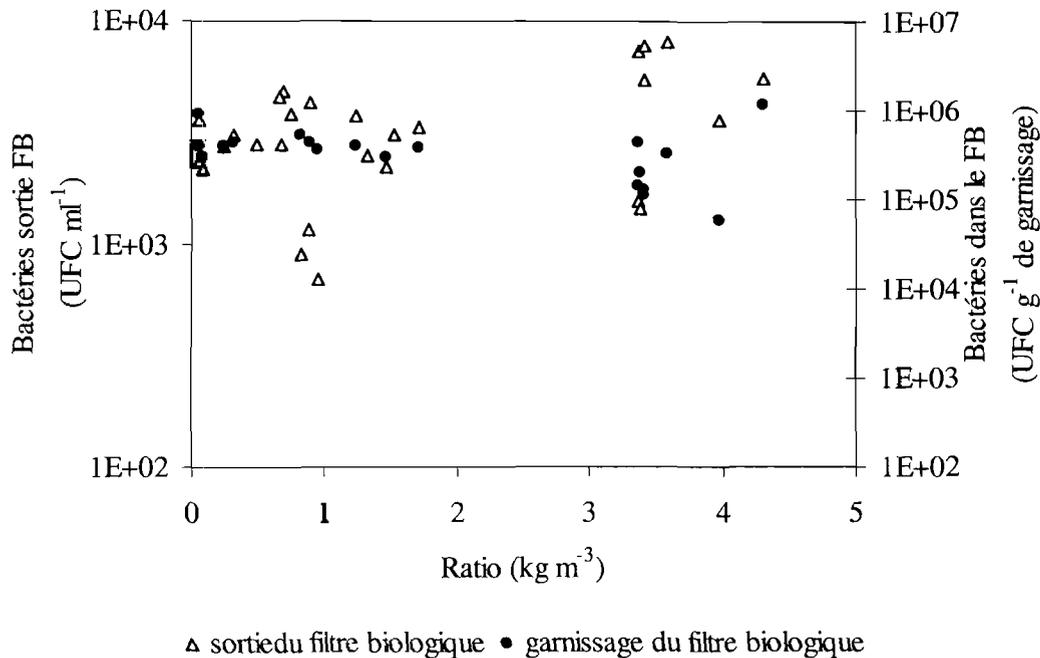


Figure n°4.7. Dénombrements dans et en sortie du filtre biologique en fonction du ratio ingéré/eau neuve.

1.3. Influence de la quantité d'aliment distribuée et de l'indice de conversion des poissons sur les populations bactériennes.

En combinant les résultats des deux expérimentations précédentes, il est possible d'établir une relation de proportionnalité entre le nombre de bactéries dans le circuit (libres et fixées) et la quantité de fèces produite par les poissons (fig. n°4.8.). Les quantités de fèces sont calculées à partir de la quantité d'aliment distribuée par jour et à partir de l'indice de conversion des poissons en appliquant la formule proposée par le CEMAGREF (1983) : $MES_{fèces} = (33 \cdot IC - 20) \cdot Q_A / 100$, Q_A étant la quantité d'aliment et IC l'indice de conversion alimentaire des poissons, les MES sont exprimé en kg.

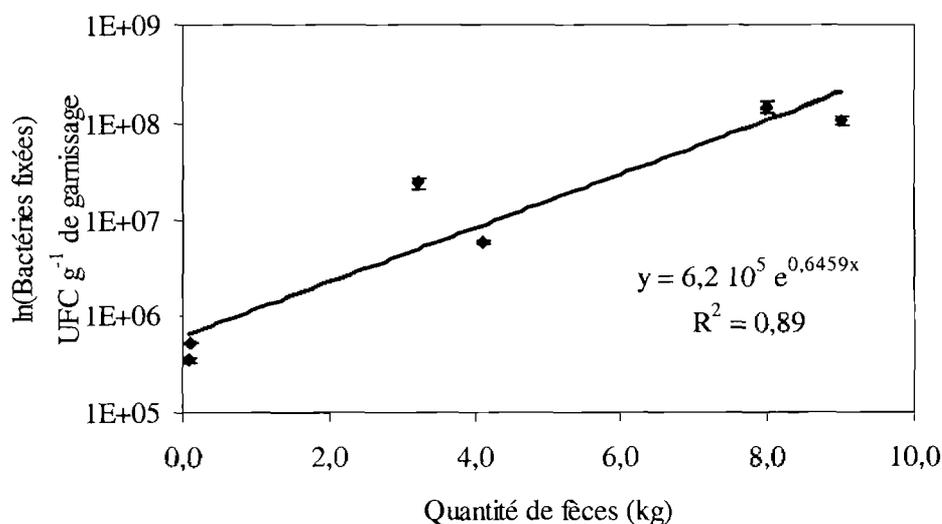


Figure n°4.8. Nombre de bactéries sur le filtre biologique en fonction des fèces produites.

1.4. Effet du rayonnement UV sur les populations bactériennes.

Le tableau n°4.1. présente les dénombrements obtenus dans les circuits expérimentaux de 6 m³, avec et sans contrôle par le réacteur UV des populations bactériennes circulantes. Les observations ont été réalisées sur 2 mois et demi, l'état d'équilibre étant atteint. Les prélèvements sont hebdomadaires et réalisés en entrée et sortie du réacteur UV et du filtre biologique pour les bactéries circulantes et dans le filtre biologique pour les bactéries fixées.

Tableau n°4.1. Influence du réacteur UV sur la flore des circuits d'élevage piscicoles.

	Sans Traitement	Traitement UV
% d'abattement	Aucun	99
Bactéries fixées sur le garnissage du FB (UFC·g ⁻¹)	$(2,0 \pm 1,0) \cdot 10^5$	$(9,8 \pm 2,3) \cdot 10^4$
Bactéries en sortie du FB (UFC·ml ⁻¹)	$(1,3 \pm 1,0) \cdot 10^4$	$(1,4 \pm 0,8) \cdot 10^3$

Les différences entre les deux traitements sont significatives pour les bactéries fixées ($F_{4,8} = 7,2$ avec $p = 0,016$) et libres ($F_{4,41} = 13,66$ avec $p = 0,0016$). Le traitement UV fait

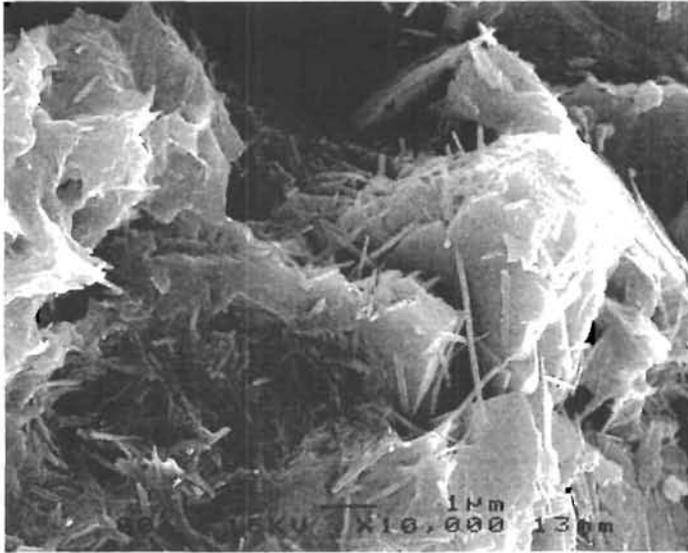
diminuer le nombre de bactéries libres sortant du filtre biologique d'un facteur 10, et également le nombre de bactéries fixées sur le garnissage d'un facteur 2. Le traitement UV provoque donc une baisse des populations bactériennes libres, ce qui induit une baisse significative des populations bactériennes fixées.

1.5. Observation du garnissage du filtre biologique.

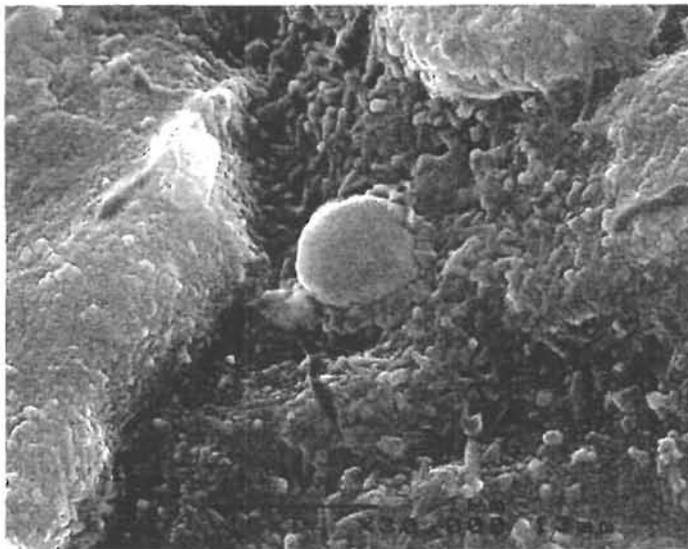
Afin de savoir si l'intérieur du garnissage des filtres biologiques était colonisé par le biofilm bactérien, nous avons observé en microscopie électronique à balayage des échantillons de garnissage. Ces prélèvements ont été réalisés dans le filtre biologique du circuit pilote de 24 m³ et des circuits expérimentaux de 6 m³. Afin d'éviter les cristaux de sel, les prélèvements ont été rincés avec une solution de formiate d'ammonium d'une salinité de 34 ‰. Le formiate d'ammonium, volatil, est éliminé au séchage. La figure n°4.9. présente les photographies du biofilm formé en surface du garnissage par les bactéries hétérotrophes (prélèvement circuit 24 m³, fig. n°4.9. a), d'une bactérie autotrophe (prélèvement circuit 24 m³; fig. n°4.9. b) et une vue de l'intérieur du garnissage (prélèvement circuit 6 m³; fig. n°4.9. c et d). Le troisième cliché (c) montre que l'intérieur des pores du garnissage n'est pas colonisé ni par les bactéries hétérotrophes, ni par les bactéries autotrophes. La majeure partie des pores du garnissage a un diamètre de 1 à 2 μm, ce qui n'est pas suffisant pour que les bactéries s'y développent.

2. CARACTERISATION DES BACTERIES.

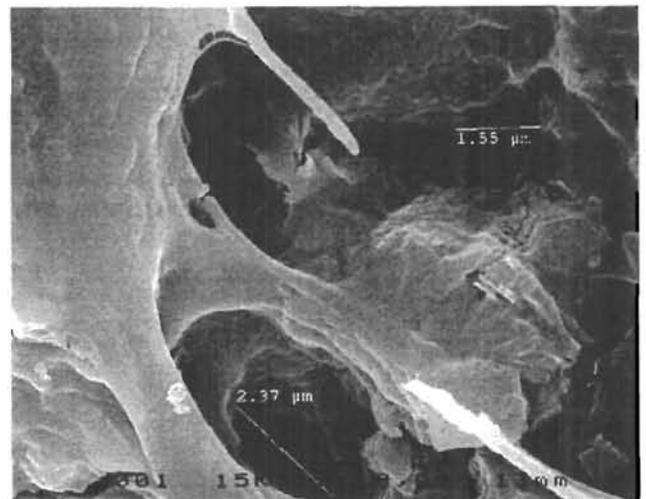
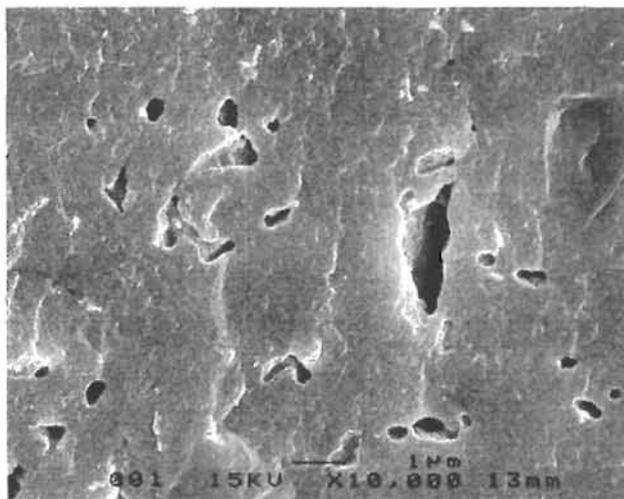
Ces expériences ont été réalisées sur le circuit pilote de 24 m³. Les prélèvements sont mensuels afin de pouvoir effectuer les identifications entre deux prélèvements. Nous avons prélevé : (1) les bactéries fixées sur les parois des bassins et de la tuyauterie et dans le garnissage du filtre biologique et (2) les bactéries libres en entrée et sortie de chaque compartiment du circuit. Lors de cette expérimentation, le fonctionnement du filtre biologique a été normal, sauf pendant un mois (juin) où le filtre biologique a eu des problèmes de colmatage. Au cours de ce mois, nous avons choisi de réaliser le prélèvement comme prévu, afin de voir si le colmatage du filtre biologique avait un effet sur les populations bactériennes du circuit.



a. Le biofilm bactérien
hétérotrophe



b. Le biofilm bactérien.



c. Vues des porosités du garnissage.

Figure n°4.9. Observation en microscopie à balayage du garnissage dans le filtre biologique nitrifiant d'un élevage piscicole recirculé.

En ce qui concerne la caractérisation des bactéries présentes dans le circuit d'élevage, de nombreux biotypes différents ont été identifiés, dont certains ne diffèrent que par un seul caractère. Toutes les bactéries isolées sont des bacilles ou des coccobacilles gram négatif. Un premier groupe est constitué de bactéries aérobies strictes ou micro aérophiles appartenant au groupe IV défini par le Bergey's Manuel. Elles appartiennent aux genres *Pseudomonas*, *Oceanospirillum*, *Marinobacter*, *Paracoccus* et *Erythrobacter*. Un second groupe est constitué par des bactéries aérobies/anaérobies facultatives, appartenant à la famille des Vibrionaceae, les deux genres (*Vibrio* et *Aeromonas*) de cette famille ont été isolés.

Tous les genres isolés sont représentés parmi les populations bactériennes fixées du circuit, où la famille Vibrionaceae peut représenter jusqu'à 20 % des souches isolées alors qu'elle n'est pas représentée parmi les populations bactériennes libres. Toutefois, il est à noter que cette situation ne s'est pas vérifiée lors du prélèvement réalisé alors que le filtre biologique colmatait. A ce moment là, on retrouve des bactéries du genre *Vibrio* de la sortie du filtre biologique jusqu'à l'entrée du réacteur UV. C'est en sortie de filtre biologique que le pourcentage de *Vibrio* est le plus élevé (50 % des souches isolées, fig. n°4.10.).

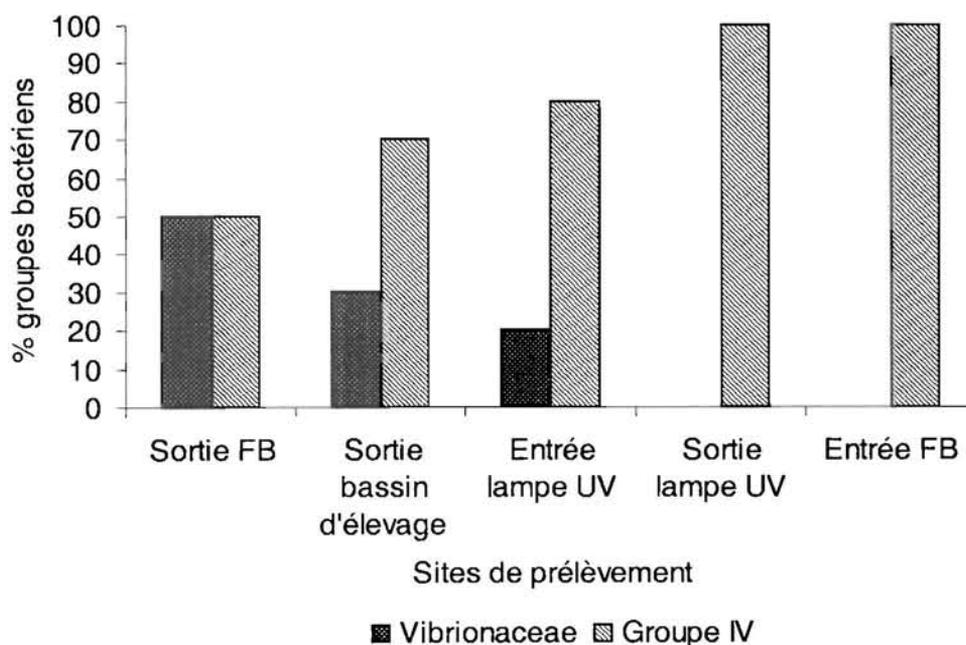


Figure n°4.10. Distribution des groupes bactériens pendant le colmatage du filtre biologique.

3. DISCUSSION.

Le nombre de bactéries fixées sur la surface des bassins d'élevage ou de la tuyauterie est à peu près constant pendant la durée de notre essai : il est égal à 10^7 UFC·cm⁻². Percival et *al.*, (1998) ont dénombré $3,6 \cdot 10^2$ UFC·cm⁻², sur des canalisations en Inox placées dans des réseaux d'eau potable. Fera et Prieur (1986) observent un biofilm bactérien sur des surfaces en contact avec de l'eau de mer de 10^7 cellules par cm² pour des surfaces en Inox, aluminium et polycarbonate. Les dénombrements de flore totale (exprimés en nombre de cellules) sont réalisés en épifluorescence par coloration de l'ADN et/ou de l'ARN des bactéries, ce qui permet de compter la flore bactérienne vivante (dont la flore non cultivable) et moribonde (Hobbies et *al.*, 1977; Zimmermann et *al.*, 1978). Les dénombrements de flore totale sont donc toujours très supérieurs à ceux de la flore cultivable. De façon approximative, on peut considérer qu'un dénombrement mesurant la flore cultivable est 10^3 fois inférieure au même dénombrement mesurant la flore totale (Kogure et *al.*, 1979). Ceci permet d'estimer le biofilm de Fera et Prieur à 10^4 UFC·cm⁻². Les dénombrements obtenus dans nos circuits sont donc relativement élevés. Toutefois, il faut noter qu'ils sont réalisés dans des conditions différentes car la vitesse de passage est faible ($0,01 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ dans nos circuits par rapport à $1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) et des teneurs en nutriment sont élevées par rapport à celles des eaux potables ou océaniques. Des biofilms beaucoup plus importants que ceux que nous observons ont été décrits dans des milieux particulièrement propices : supérieurs à 10^{10} UFC·cm⁻² (Ganderson, 1992; Personné et *al.*, 1995).

La répartition des bactéries libres dans le circuit est hétérogène. Sich et Van Rijn (1992) observent le même phénomène dans leur propre circuit piscicole. Leur système de traitement de l'eau diffère du nôtre sur de nombreux aspects (chapitre 1., § 2.2.1.). Dans leurs conditions, les dénombrements dans le bassin d'élevage et le filtre biologique s'élèvent de 10^8 bactéries par ml (soit 10^5 UFC·ml⁻¹) et atteignent un maximum dans le filtre dénitrifiant à 10^{10} bactéries par ml. Korzeniewski et Korzeniewska (1982) dénombrent 10^5 UFC·ml⁻¹ dans des eaux proches de cages d'élevage de truites. Nos valeurs se situent donc au même niveau que celles observées en élevage en cage et sont légèrement inférieures à celles observées par Sich et Van Rijn (1992). Ces comparaisons ne peuvent être plus précises car les techniques de numération employées et les systèmes d'élevage sont différents.

L'absence de corrélation entre l'augmentation du nombre de bactéries dans le bassin d'élevage et la biomasse de poissons montre que la flore dominante ne contient pas de

bactéries provenant directement des poissons. Ceci est confirmé par l'étude statistique qui montre que les dénombrements en entrée et en sortie du bassin d'élevage ne sont pas statistiquement différents.

L'augmentation du nombre de bactéries entre l'entrée et la sortie du filtre biologique ne peut pas s'expliquer que par la croissance bactérienne des bactéries libres entrantes, car le temps de séjour dans le réacteur n'est que de quelques minutes (ce qui ne permet pas la division d'un grand nombre de bactéries). L'augmentation du nombre de bactéries circulantes provient donc certainement de la libération des bactéries fixées sur le garnissage du filtre biologique. On peut illustrer ce phénomène dans le bassin d'élevage où tous les paramètres sont connus (tableau n°4.2.) et où nous avons montré que les poissons ne produisaient pas de bactéries appartenant à la flore dominante. On appelle k_{det} la constante qui caractérise le nombre de bactéries fixées qui sont libérées dans l'eau d'élevage par heure.

Tableau n°4.2. Dimensions du bassin (circuit 24 m³) et paramètres biologiques.

Paramètres	Valeurs
Volume du bassin	10 10 ⁶ ml
Surface des parois	22 10 ⁴ cm ²
Débit	14 10 ⁴ ml·h ⁻¹
Nombre de bactéries fixées	1,5 10 ⁷ UFC·cm ⁻²
Nombre de bactéries libres en sortie de bassin	1,73 10 ⁴ UFC·ml ⁻¹
Nombre de bactéries en entrée de bassin	1,1 10 ⁴ UFC·ml ⁻¹
Taux de croissance des bactéries	0,25 h ⁻¹

A l'équilibre, le bilan de bactéries dans le bassin d'élevage s'écrit alors :

$$\delta x / \delta t = 0 = d x_0 - d x + \mu x + k_{det} X_f / V_{bas}$$

avec x_0 : concentration en bactérie en entrée de bassin (UFC·ml⁻¹)
 x : concentration en bactérie en sortie de bassin (UFC·ml⁻¹)
 X_f : nombre total de bactéries fixées (UFC)
 k_{det} : coefficient de détachement (h⁻¹)
 d : taux de dilution (h⁻¹)
 V_{bas} : le volume du bassin (ml)

Si on prend l'hypothèse que k_{det} est nulle,

$$\text{alors } x = d \cdot x_0 / (d - \mu)$$

$x = 1,35 \cdot 10^4 \text{ UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$. Comme cette valeur est inférieure à la concentration observée ($1,75 \cdot 10^4 \text{ UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$), c'est donc qu'il existe une autre source de bactéries libres. Ceci est d'autant plus vrai que nous avons pris en compte un taux de croissance élevé par rapport à ceux que nous avons observé (chapitre 6. modélisation bactérienne) : $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$.

Si on considère que les bactéries proviennent du biofilm des parois du bassin,

On peut alors calculer k_{det}

$$k_{det} = [(X \cdot (d + \mu) - d \cdot x_0) \cdot V_{bas} / X_f]$$

$$k_{det} = 0,0136 \text{ h}^{-1}.$$

Les biofilms bactériens du circuit libèrent des bactéries dans les eaux d'élevage. Les bactéries sont libérées au niveau de la paroi du bassin à un taux de $0,0136 \text{ h}^{-1}$. Cette valeur est plus faible, mais du même ordre de grandeur que celle de Bois et *al.*, (1997) ($0,036 \text{ h}^{-1}$), dans des canalisations où les vitesses de passage sont beaucoup plus rapides que les nôtres.

Les essais avec et sans réacteur UV mettent en évidence qu'il existe aussi des phénomènes de fixation des bactéries libres sur le garnissage du filtre biologique. Les UV n'agissent que sur les bactéries circulantes du circuit, quand elles passent devant la lampe. Pour les deux systèmes que nous avons étudiés ($24 \text{ puis } 6 \text{ m}^3$), les abattements bactériens ont été de 95 et 99 % de la flore circulante. Dans les circuits expérimentaux de 6 m^3 , l'arrêt du réacteur UV provoque une augmentation du nombre de bactéries libres mais aussi fixées sur le garnissage du filtre biologique, puis une stabilisation à des valeurs respectivement 10 et 2 fois supérieures. L'augmentation du nombre de bactéries fixées s'explique par l'augmentation du nombre de bactéries libres qui se fixent sur le garnissage du FB. L'étude des deux situations, avec et sans traitement UV, nous permet de calculer la proportion de bactéries libres qui se fixent sur le garnissage. On appelle k_{fix} la constante de fixation des bactéries libres sur le garnissage du filtre biologique. Le tableau n°4.3. rappelle les différentes données caractérisant les deux états d'équilibres.

Tableau n°4.3. Descriptions des états d'équilibre bactériens avec et sans traitement UV.

Paramètres	Avec traitement UV (1)	Sans traitement UV (2)
Bactérie en entrée de FB : x_0	0	$1,3 \cdot 10^4$
Bactéries libres dans le FB : x_L (UFC ml^{-1})	$1,4 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^4$
Bactéries fixées sur le garnissage du FB : x_F (UFC g^{-1})	$2,0 \cdot 10^5$	$9,8 \cdot 10^4$
Poids de garnissage (g)		$8 \cdot 10^5$
Volume d'eau dans le filtre biologique (ml)		$2 \cdot 10^5$
Taux de dilution (h^{-1})		30

Si l'on néglige la multiplication des bactéries devant le taux de dilution, la variation de bactéries libres s'écrit de la façon suivante pour chacun des deux équilibres (1) et (2) :

pour l'état d'équilibre (1) avec traitement UV, $x_0(1) = 0$

$$0 = -d x_L(1) - k_{fix} x_L(1) + k_{det} x_F(1) P_{fb}/V_{fb}$$

pour l'état d'équilibre (2) sans traitement UV

$$0 = d x_0(2) - d x_L(2) - k_{fix} x_L(2) + k_{det} x_F(2) P_{fb}/V_{fb}$$

soit: $k_{det} = (V_{fb} / P_{fb}) \cdot (x_L(1) / x_F(1)) \cdot (k_{fix} + d)$

$$k_{fix} = d [1 / (1 - (x_F(1) x_L(2))) / (x_F(2) \cdot x_L(1))]$$

L'application numérique donne :

$$k_{fix} = 8,45 \text{ h}^{-1}$$

$$k_{det} = 0,067 \text{ h}^{-1}$$

Les bactéries libres ont tendance à se fixer sur le garnissage du filtre biologique, alors que les bactéries fixées se détachent dans l'eau. Les constantes de cet équilibre dans le filtre biologique sont les constantes de détachement et de fixation dont les valeurs sont respectivement de l'ordre de 0,067 et 8,45 h⁻¹. Ces constantes sont spécifiques du type de garnissage utilisé (tableau n°4.4.) et de la vitesse de passage (Bott et Miller, 1983). Afin de savoir si les constantes de fixation et d'échange dépendent de la vitesse de passage, nous avons réalisé des essais *in vitro*. Les résultats de ces expériences sont présentés dans la partie modélisation bactérienne.

Tableau n°4.4. Valeurs des coefficients de détachement et de fixation de trois modèles.

Constante	Support	vitesse de passage	valeur (h ⁻¹)	Référence
Fixation	Charbon actif		200	Billen et <i>al.</i> , (1992) "Chabrol Model"
Détachement	Charbon actif		1	
Fixation	Sable		100	Billen et <i>al.</i> , (1992) "Chabrol Model"
Détachement	Sable		5	
Fixation	Paroi tuyauterie	1 m · s ⁻¹	0,15-0,5	Servais et <i>al.</i> , (1995)
Détachement	Paroi tuyauterie	1 m · s ⁻¹	1-2	"Sancho Model"
Fixation	Paroi tuyauterie	1 m · s ⁻¹	0,24 0,37	Bois et <i>al.</i> , (1997)
Détachement	Paroi tuyauterie	1 m · s ⁻¹	0,039 0,020	

L'étude de nos valeurs de fixation et de détachement et celles de la bibliographie montre que:

(1) le coefficient de fixation est toujours supérieur au coefficient de détachement, sauf dans le Sancho Model où le support à une capacité maximale de fixation des bactéries particulièrement basse (0,3 à 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$).

(2) les échanges entre bactéries fixées et libres sont d'autant plus importants que le rapport surface / volume colonisable est important: charbon actif>sable>paroi tuyauterie. Nos valeurs pour le filtre biologique, se situent juste après le sable, ce qui paraît un normal compte tenu du fait que la colonisation du garnissage de nos circuits ne s'est faite qu'en surface. Le garnissage étant constitué de "cailloux" de 1-2 cm de diamètre sa surface spécifique est inférieure à celle d'un garnissage sableux (même si le sable est grossier).

(3) Pour la paroi des bassins un coefficient de détachement l'ordre de 0,0136 h^{-1} , est dans l'intervalle de mesure de Bois et *al.*, (1997). Cette valeur correspond bien à une surface de colonisation de type paroi lisse.

Les niveaux bactériens sont stables quelle que soit la fermeture du circuit. En revanche, ils augmentent quand la quantité de carbone particulaire atteignant le filtre biologique augmente (fig. n° 4.8.). Il semble donc que le COD dans l'eau d'élevage ne soit pas la source principale de carbone des bactéries fixées : elles utiliseraient préférentiellement le carbone contenu dans les fèces après l'avoir hydrolysé au sein du biofilm en carbone organique dissous. Les bactéries libres provenant des bactéries fixées, toute la dynamique des populations bactériennes semble donc liée, non pas à l'accumulation de substances dissoutes, mais plutôt à la matière organique particulaire. La quantité de matière particulaire est fonction de la quantité d'aliment distribuée, de l'indice de conversion des poissons, de l'efficacité de la filtration mécanique ... et de la gestion et de la conception du système d'élevage.

Reay et *al.*, (1999) ont étudiés les besoins en azote de différents types de populations bactériennes hétérotrophes. Pour celles que l'on retrouve dans les élevages piscicoles, les constantes de saturation vis à vis du substrat azoté sont comprises entre 9 et 29 $\text{N-NH}_3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pour l'ammoniaque de 30 à 160 $\text{N-NO}_3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pour les nitrates. Les concentrations mesurées dans nos circuits sont donc 10 fois supérieures pour l'ammoniaque et plus de 100 fois supérieures pour les nitrates, ce qui montre que l'azote n'est pas un facteur limitant pour la croissance des bactéries hétérotrophes.

Les résultats des identifications bactériennes confirment le rôle principal des bactéries fixées puisque tous les genres présents dans le circuit ont été également isolés parmi les populations fixées. En ce qui concerne les genres isolés dans nos circuits, les résultats sont

concordants avec ceux de Paat et *al.*, (1989) qui isolent les trois genres : *Pseudomonas*, *Flavobacterium* et *Vibrio* dans des piscicultures en circuit fermé de Carpes. Dans leur système et le nôtre, la flore isolée est commune à celle des environnements aquatiques, ce qui montre que les caractéristiques du milieu d'élevage n'ont pas sélectionné une flore hétérotrophe particulière. Le genre *Vibrio* n'a été isolé régulièrement que sous forme fixée sur les parois des tuyaux, des bassins d'élevage et sur le garnissage du filtre biologique. Sous forme libre, ce genre n'a été isolé qu'une seule fois, lors du colmatage du filtre biologique. Ce phénomène de colmatage a probablement induit la formation de chemins préférentiels, qui ont engendré des zones d'anaérobioses, où les bactéries aérobies facultatives (famille Vibrionaceae) ont pu se développer, contrairement aux bactéries aérobies strictes du Groupe IV. Les différences de métabolisme respiratoire expliquent pourquoi les faibles concentrations en oxygène favorisent les Vibrionaceae par rapport aux bactéries du groupe IV. Le filtre biologique est la plus grosse source de bactéries du circuit quand il fonctionne de façon correcte (pas de colmatage dû à l'accumulation de matière organique, résiduel d'oxygène en sortie...) : les *Vibrionaceae* ne font pas partie de la flore dominante libérée dans l'eau d'élevage.

4. CONCLUSION.

Notre étude montre que dans les élevages piscicoles, les bactéries circulantes sont en équilibre avec les bactéries fixées. Les constantes de fixation et de détachement qui caractérisent cet équilibre montrent que les bactéries libres ont tendance à se fixer. Les bactéries fixées se détachent à une vitesse moindre. Toutefois, de par l'importance des surfaces colonisées, c'est le détachement des bactéries fixées qui est la source la plus importante de bactéries circulantes dans les eaux d'élevage. Ces résultats sont confirmés par les identifications bactériennes qui montrent que les bactéries fixées contiennent tous les types de bactéries isolées dans le circuit. Les populations bactériennes fixées sont donc l'élément fondamental de la dynamique des populations bactériennes des circuits fermés piscicoles. Les essais de fermeture ont montré que le COD dans l'eau d'élevage n'était pas la source principale de carbone des bactéries fixées qui utiliseraient prioritairement le carbone issu de l'hydrolyse du carbone particulaire présent dans les fèces des poissons et se déposant sur le biofilm bactérien.

Un début de modélisation de la dynamique de ces populations sera présenté dans le chapitre 7.. L'objectif du modèle est de déterminer le nombre de bactéries dans le filtre biologique en fonction de la gestion des paramètres zootechniques du circuit piscicole.

**CHAPITRE 5. ETUDE DE L'INFLUENCE DU TAUX DE FERMETURE SUR LA
CROISSANCE DU BAR.**

La diminution des apports d'eau neuve dans les circuits recyclés est un objectif important qui permettra d'installer des systèmes de production à terre loin des sources d'eau de mer, d'abaisser les coûts de traitement de l'eau neuve (pompage mais surtout chauffage et oxygénation) et de traiter les eaux de rejet. Au préalable, il faut toutefois s'assurer que l'accumulation des substances chimiques (nitrates, phosphates et substances humiques) dans les eaux d'élevage ne dégrade pas le taux de croissance et/ou l'indice de conversion alimentaire des poissons. Durant nos expérimentations, deux expériences d'élevage de bar ont été conduites dans les circuits expérimentaux de 6 m³. La croissance de ces différents lots est présentée et analysée dans ce chapitre.

Nous avons suivi les TCJ et les IC des poissons, en comparant deux à deux, trois degrés de fermeture. Dans un premier temps, un circuit recirculé très ouvert a été comparé à un circuit recirculé très fermé : les ratios (ingéré sur eau neuve) étant respectivement de 0,06 et 3 kg·m⁻³. Cette expérience nous a permis de savoir si la fermeture des circuits est un frein à la croissance des poissons. Dans un second temps, deux circuits recirculés à deux niveaux de fermeture différents (1 et 3,5 kg·m⁻³) ont été comparés afin de déterminer si la baisse de croissance est proportionnelle à la fermeture du circuit. Le ratio de 1 kg·m⁻³ correspond à un niveau de fermeture "classique" dans les piscicultures industrielles en circuit recirculé.

De façon à s'affranchir des effets de la température et du poids moyen des poissons, les taux de croissance journalier seront comparés à ceux du modèle Tanguy et Le Grel (1989). Ce modèle a été mis au point à partir de données de croissance de bar élevé en cages, sur tout le littoral français. Il ne prend pas en compte les phénomènes de maturation des poissons qui provoquent des ralentissements de croissance.

1. COMPARAISON DES PERFORMANCES ZOOTECHNIQUES DU BAR A DIFFERENTS DEGRES DE FERMETURE.

1.1. Comparaison de la croissance du bar dans deux circuits recirculés : l'un très ouvert et l'autre fermé.

Le premier circuit, considéré comme le circuit témoin, est un des deux circuits expérimentaux de 6 m³ dont les bassins ne sont pas équipés de pièges à particules permettant d'évaluer le non ingéré. Dans ce circuit, la quantité d'aliment ingéré est assimilée à l'aliment distribué. Les renouvellements en eau sont importants : le ratio ingéré sur eau neuve est de l'ordre de 0,06 kg·m⁻³ et la concentration en nitrates dans ce bassin ne dépasse pas 2 mg·l⁻¹ de

N-NO₃, les concentrations en nitrites sont inférieures à 0,1 mg·l⁻¹. Le second circuit est l'autre circuit expérimental de 6 m³ dans lequel le ratio R est de 3 kg·m⁻³.

Durant cette expérience, les poids individuels des poissons de chaque bassin ont été mesurés à 4 reprises, toutes les 3-4 semaines, définissant ainsi 3 périodes d'étude. La figure n°5.1. présente l'évolution des poids moyens à chacune des pesées.

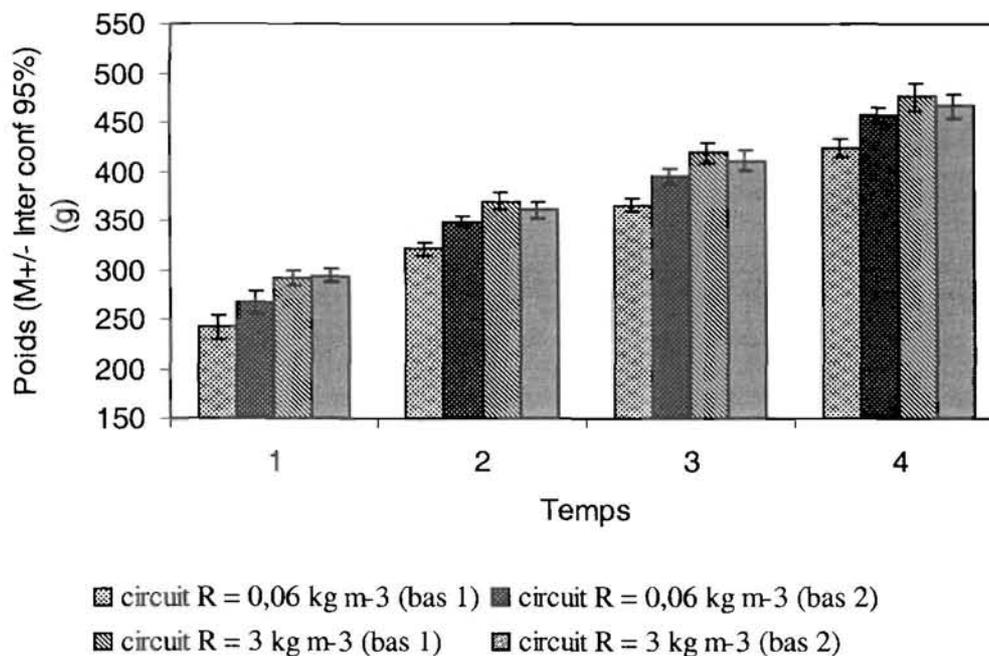


Figure n°5.1. Evolution des poids moyens dans chaque bassin des circuits recirculés témoin (ouvert) et fermé à un ratio de 3 kg·m⁻³.

L'évolution des différences entre les TCJ calculés à partir du modèle Tanguy et Le-Grel (1989) et ceux des poissons de nos essais, durant les trois périodes d'étude est présentée dans la figure n°5.2.

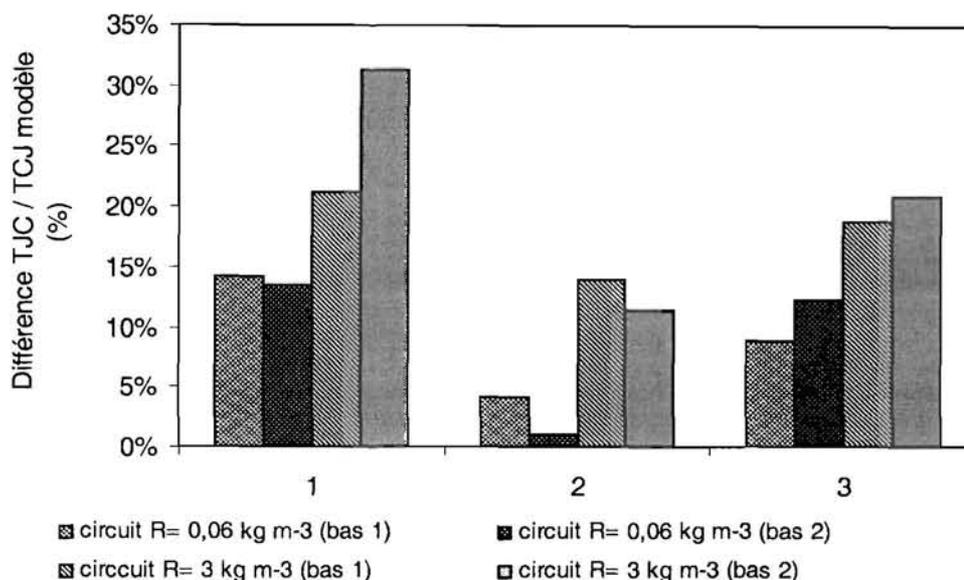


Figure n°5.2. Différences entre TCJ réels et TCJ théoriques du modèle de Tanguy-Le Grel (1989) pour les poissons des circuits recirculés ouvert et très fermé.

Les tests statistiques comparant les bassins de chaque circuit montrent que sur les trois périodes considérées, la différence de croissance est significative pour les périodes 2 et 3 ($F_{18,5} = 25,4$, avec $p = 0,037$; pour la deuxième période et $F_{18,5} = 22,1$ avec $p = 0,042$ pour la troisième période). Durant ces périodes, les taux de croissance du circuit le plus ouvert sont supérieurs de 10 % aux taux de croissance des poissons en circuit recirculé à $R = 3 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$. Ceci montre qu'il existe une baisse de croissance dans les circuits très fermés par rapport à un circuit quasiment ouvert. En revanche, cette baisse n'est que de 10 % par rapport au TCJ.

1.2. Comparaison de la croissance du bar à deux degrés de fermeture importants.

Nous avons profité des expériences menées sur la caractérisation du milieu d'élevage pour suivre la croissance des poissons dans les deux circuits expérimentaux de 6 m^3 sur lesquels ces travaux étaient réalisés. Les degrés de fermeture sont de 1 et $3 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ pendant 2 mois, puis les circuits sont progressivement réouverts. Le tableau n°5.1. présente, pour chacune des phases correspondant à un ratio donné, les performances zootechniques des poissons. Les poids moyens des deux bassins de chaque circuit sont statistiquement comparables : les taux de croissance présentés correspondent aux taux de croissance moyens obtenus pour chaque circuit en ne considérant qu'un bassin unique.

Tableau n°5.1. Evolution des performances zootechniques des poissons pendant les essais sur les circuits expérimentaux de 6 m³.

Circuit	R	Poids moyen (g)	TCJ* (% par jour)	TCJ* théorique	TAJ* (% par jour)	IC* (sans unité)
1	3	290	0,83	0,87	1,02	1,38
1	1,66	353	0,71	0,81	0,97	1,28
1	1,11	402	0,32	0,60	0,57	1,78
1	0,38	445	0,30	0,52	0,50	1,64
2	1,11	364	0,78	0,84	1,02	1,33
2	1,11	392	0,39	0,59	0,61	1,58
2	0,38	489	0,41	0,53	0,62	1,53

Avec TCJ : le taux de croissance journalier; TAJ : le taux d'alimentation journalier et IC : l'indice de conversion alimentaire.

La comparaison des taux de croissance théorique et réels montre que le TCJ théorique est toujours supérieur aux TCJ mesurés (fig. n°5.3. et 5.4.). La comparaison des phases les plus fermées, $R = 3 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ pour le premier circuit et $R = 1 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ pour le second, montre qu'il n'y a pas de différence de croissance entre les poissons élevés à ces deux ratios de fermeture. Si la fermeture des circuits provoque une baisse de croissance, elle existe déjà pour un ratio de $1 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ et elle n'augmente pas quand on ferme le circuit à $3 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Après réouverture des circuits, nous n'avons pas observé de reprise de croissance, au contraire les écarts de croissance augmentent, car les poissons sont en phase de maturation sexuelle. La maturation provoque chez les bars de sexe mâle une baisse sensible de la croissance (Barnabé, 1972). Les indices de conversion sont compris entre 1,3 et 1,7 : on ne remarque pas d'évolution particulière en fonction du ratio. En revanche, les plus défavorables sont observés en fin d'expérimentation. Ils correspondent aussi aux plus mauvais taux de croissance.

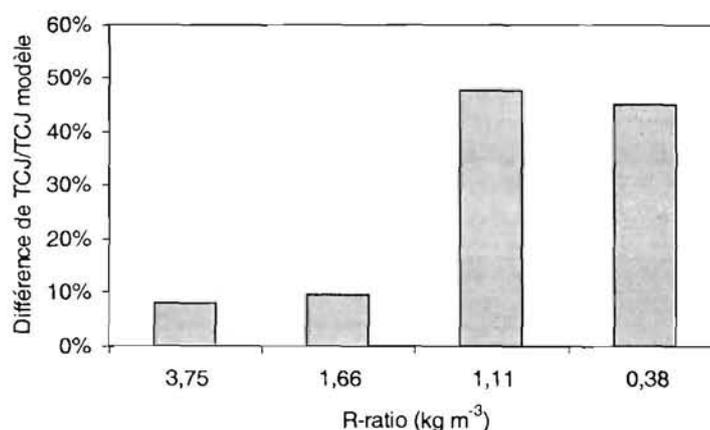


Figure n°5.3. Evolution du TCJ et du TCJ théorique dans le circuit d'élevage initialement fermé à $3 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$.

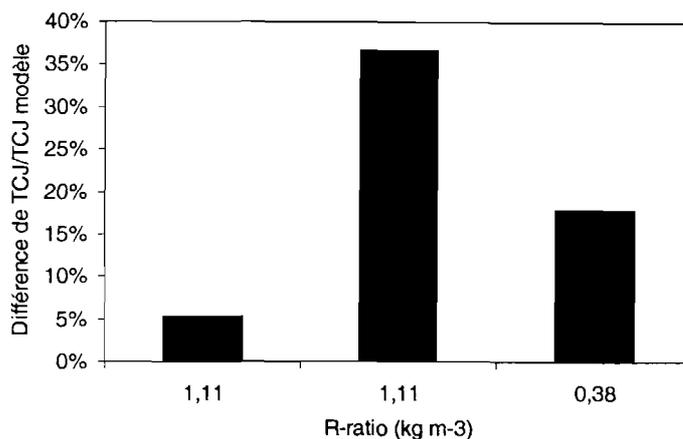


Figure n°5.4. Evolution du TCJ et du TCJ théorique dans le circuit d'élevage initialement fermé à $1,1 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$.

3. DISCUSSION ET CONCLUSION.

Les essais réalisés sur les circuits expérimentaux de 6 m^3 permettent de comparer la croissance des poissons pour des renouvellements en eau très importants ($R = 0,06 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$) ou très faibles ($R = 3 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$). En comparant les taux de croissance obtenus avec les taux de croissance théoriques, on constate qu'il y a un effet de la fermeture du circuit sur la croissance des poissons, puisque après une période de 3 semaines, les poissons du circuit le plus ouvert grandissent plus vite que ceux du circuit fermé (taux de croissance journalier supérieur de 10 %). Il est toutefois difficile de savoir de façon précise à quoi sont dues ces baisses de croissance. Les concentrations en nitrites et en ammoniacque sont restées inférieures à $0,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de N, les nitrates ont atteint $160 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, encore loin du seuil létal de $293 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ (Pearson-Le Ruyet et Boeuf, 1998). On a cependant peut être dépassé la "concentration la plus faible ayant un effet" (LOEC). Le fait que les croissances soient comparables pour $R = 1 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ (la concentration en nitrates est de $40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) et à $R = 3 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ (la concentration est de $160 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$) rend peut probable l'hypothèse d'avoir dépassé la LOEC des nitrates. Il reste donc les substances humiques, dont l'effet devrait être confirmé par des essais d'éco-tolérance en soumettant les poissons à des eaux contenant différentes concentrations en SH. Pour ce faire, il faut disposer de grandes quantités de SH pures. Il faudrait pour cela réaliser des extractions de SH à partir d'eaux d'élevage, mais c'est une opération longue et délicate si l'on veut obtenir un extrait homogène. On peut signaler que le fournisseur de produit chimique

Aldrich vend des SH, mais elles sont d'origine terrestre et donc de nature différente des SH isolées dans nos circuits.

Afin de situer le degré de fermeture à partir duquel les poissons pourraient être gênés, nous avons comparé deux niveaux de fermeture importants : R égal à 1 et à $3 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Nous constatons que les taux de croissance et les indices de conversion sont les mêmes pour ces deux niveaux de fermeture. De plus, la réouverture brutale des circuits ne provoque ni augmentation de la prise alimentaire, ni phénomène de croissance compensatrice. Il semblerait donc que, si l'accumulation d'une substance consécutive à la fermeture du circuit gêne les poissons, cet effet ne soit pas proportionnel à la concentration de cette substance. Le phénomène existerait dès $R = 1 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. On ne peut exclure l'hypothèse que les poissons s'adaptent progressivement à l'accumulation de(s) substance(s) gênante(s), puisque l'état d'équilibre correspondant au degré de fermeture est atteint en respectivement 3 et 9 semaines.

On peut toutefois remarquer que la baisse du TCJ dans les circuits fermés à 1 et $3 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ par rapport au circuit fermé à $0,06 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ n'est que de 10 %. Cette différence représenterait, pour un élevage d'un an à 22°C à partir d'alevins de 50 g, une différence de 100 g sur le poids final des poissons : 540 g au lieu de 640 g. Ces calculs théoriques sont réalisés à partir des TCJ proposés par le modèle de Tanguy et Legrel (1989). Il n'est donc pas certain que la croissance des poissons pourrait rester aussi élevée sur toute une année : les 640 g au bout d'un an sont vraisemblablement surestimés. En revanche, des études sur de longues périodes en circuits recirculés à des ratios de l'ordre de $0,2 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ont montré, qu'en un an, des poissons de 50 g pouvaient atteindre le poids de 550 g (Gasset, 2000).

Il semble donc que la fermeture des circuits puisse provoquer une baisse de 10 % du taux de croissance journalier. Les substances humiques pourraient en être responsables mais seuls des essais d'écotolérance pourraient le prouver définitivement. De toute façon, ces baisses de croissance ne sont pas très importantes (-10 % sur le taux de croissance journalier), comparé à tous les avantages économiques et écologiques que permettent une réduction des apports d'eau (coût de pompage, de chauffage, dimensionnement du traitement des rejets par lagunage...).

CHAPITRE 6. ESSAIS D'OZONATION.

Dans les élevages piscicoles, deux techniques de désinfection sont utilisées : le rayonnement Ultra Violet (Chandler, 1997) et l'oxydation par l'ozone (Blogoslawski, et *al.*, 1992; Ramos et Ring, 1980).

Le traitement par le rayonnement Ultra Violet a un effet sur les populations bactériennes qui passent dans le réacteur UV (les bactéries circulantes). Aux doses habituellement utilisées (15-20 mJ·cm⁻²), il n'a pas d'action directe sur la chimie des eaux.

En eau de mer, l'ozone est instable et forme immédiatement des composés à fort pouvoir oxydant : les oxydants totaux résiduels (OTR) qui sont rémanents dans les eaux d'élevage. Ce sont les OTR qui agissent alors sur la matière organique et les cellules bactériennes. En eau douce, l'ozone sous forme de gaz dissous agit directement; il peut être facilement éliminé par dégazage. Les techniques développées sont donc très différentes en fonction du type d'eau.

Le traitement ozone a deux actions simultanées : (1) un effet bactéricide sur les populations bactériennes et (2) un effet sur les composés chimiques grâce au fort potentiel oxydant des OTR (et de l'ozone dans le réacteur). Ces actions peuvent avoir lieu dans le réacteur d'ozonation mais aussi dans l'ensemble du circuit, s'il reste de l'ozone ou des OTR dans l'eau. Ceci pourrait donc permettre de traiter les bactéries fixées et la matière organique accumulée dans le filtre biologique par exemple. Il était donc intéressant de tester ce type de traitement, avec l'objectif de suivre son effet oxydant sur les substances humiques et son effet bactéricide sur les populations bactériennes libres et fixées dans le filtre biologique. Le réacteur d'ozonation a été placé juste avant le filtre biologique. En eau de mer, les OTR formés dans l'eau peuvent agir sur les branchies des poissons. Dans cette étude, les performances des poissons élevés dans les eaux soumises au traitement d'ozonation seront comparées à celles des poissons du circuit témoin et une étude des effets des OTR sur les branchies de ces poissons sera présentée.

Toutes les expérimentations concernant l'ozone ont été réalisées sur les deux circuits expérimentaux de 6 m³ : équipé l'un d'un réacteur d'ozonation de 300 litres, et l'autre un réacteur UV. La fermeture des circuits est importante puisque le ratio ingéré sur eau neuve est maintenu à 3 kg·m⁻³. Les essais ont duré 4 mois, dont 1 mois de régime transitoire pour atteindre l'équilibre des concentrations correspondant au ratio de 3 kg·m⁻³. Les paramètres chimiques analysés sont : les oxydants totaux résiduels (OTR) formés par l'ozone, les trois formes d'azote minéral, le COD, les SH et la couleur de l'eau. En ce qui concerne la bactériologie, les populations hétérotrophes libres et fixées dans le filtre biologique seront dénombrées. Les concentrations en OTR seront données en mg·l⁻¹ de Cl₂, pour les exprimer en "équivalent ozone", il faut multiplier les mesures par 0,67. Les prélèvements de bactéries

circulantes sont réalisés en entrée et sortie du filtre biologique, du réacteur UV ou du réacteur d'ozonation. Les bactéries fixées sur le garnissage du filtre biologique de chaque circuit seront aussi dénombrées.

1. L'EFFET DES OXYDANTS TOTAUX RESIDUELS (OTR) SUR LES PARAMETRES CHIMIQUES DES EAUX.

1.1. Les concentrations en oxydants totaux résiduels (OTR).

La figure n°6.1. présente les concentrations en OTR dans le circuit d'élevage ayant subit le traitement d'ozonation. La concentration en OTR dans le circuit témoin équivaut à $0,03 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Cl_2 .

La concentration en OTR dans le circuit ozoné n'est pas stable d'un prélèvement à l'autre et les concentrations évoluent de $0,05$ à $0,20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Cl_2 , alors que la quantité d'ozone injectée est constante. Pour expliquer ces variations, nous avons recherché les éventuelles corrélations entre les OTR et la quantité d'aliment ingérée par les poissons, puis entre les OTR et la température de l'eau d'élevage.

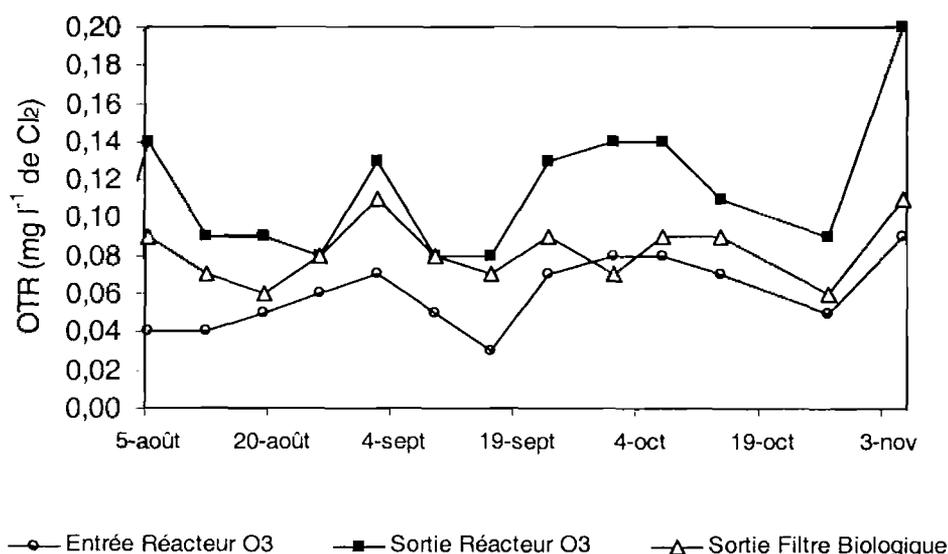


Figure n°6.1. Concentrations en OTR au cours du temps.

1.2. Relation entre oxydants totaux résiduels et température.

La figure n°6.2. présente la concentration en OTR en sortie du réacteur d'ozonation en fonction de la température. Il n'y a pas de corrélation forte entre OTR et température.

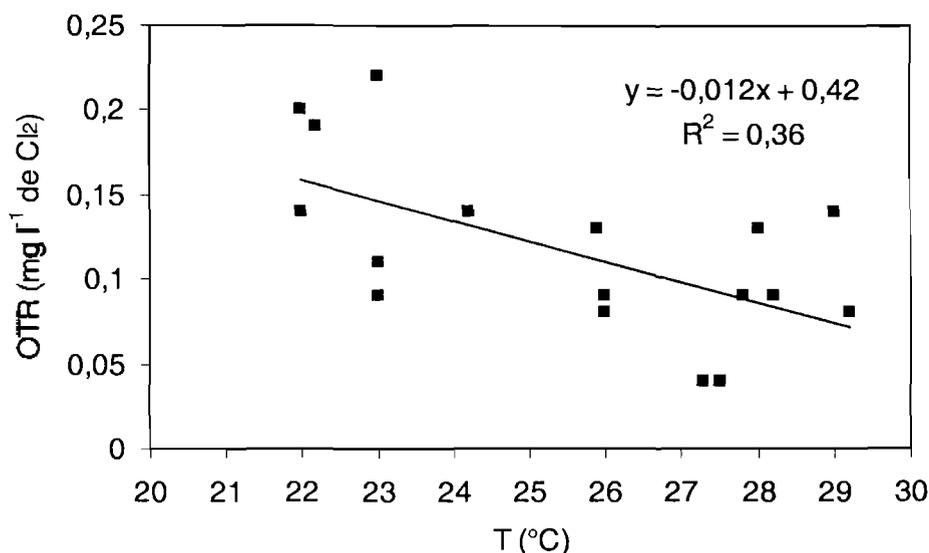


Figure n°6.2. Relation entre la température et la concentration en OTR.

1.3. Relations oxydants totaux résiduels et quantité d'aliment distribuée.

La figure n°6.3. présente les concentrations en OTR en sortie de filtre biologique et en sortie de bassin en fonction de la quantité d'aliment ingéré par les poissons (ingéré sur la semaine qui se termine le jour du prélèvement). Pour les deux sites de prélèvement (sortie filtre biologique et sortie bassin), il existe une relation de type linéaire entre la concentration en OTR et la prise alimentaire des poissons :

$$\text{OTR}_{\text{sortie FB}} = 6 \cdot 10^{-5} \cdot Q_{\text{alim}} + 0,815$$

Avec $\text{OTR}_{\text{sortie FB}}$: concentration en OTR en sortie du FB en $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de Cl_2

Q_{alim} : quantité d'aliment distribuée en g par semaine.

Les quantités d'aliment consommées dans chaque bassin du circuit ozoné ne sont pas significativement différentes. Les concentrations en OTR observées au cours de cet essai n'ont donc pas d'influence sur la quantité d'aliment demandée par les poissons. En revanche, plus les poissons mangent, plus les apports au le circuit de matières organiques augmentent. Ceci induit une plus forte demande en ozone et donc une diminution des OTR.

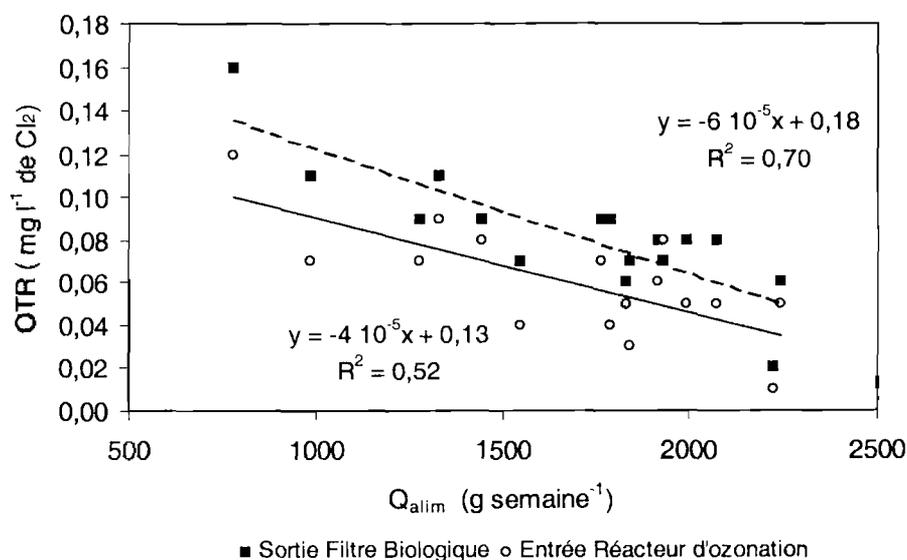


Figure n°6.3. Relation entre la quantité d'aliment ingéré et la concentration en OTR.

1.4. Influence des oxydants totaux résiduels sur le COD.

La figure n°6.4. présente l'évolution du COD dans les deux circuits expérimentaux. La concentration en COD est la même dans les deux circuits, ce qui montre que l'oxydation du COD n'est pas totale et ne va pas jusqu'à la formation de carbone inorganique (CO_2). Ceci est confirmé par le fait qu'il n'y a pas de baisse du COD entre l'entrée et la sortie du réacteur d'ozonation (fig. n°6.5.).

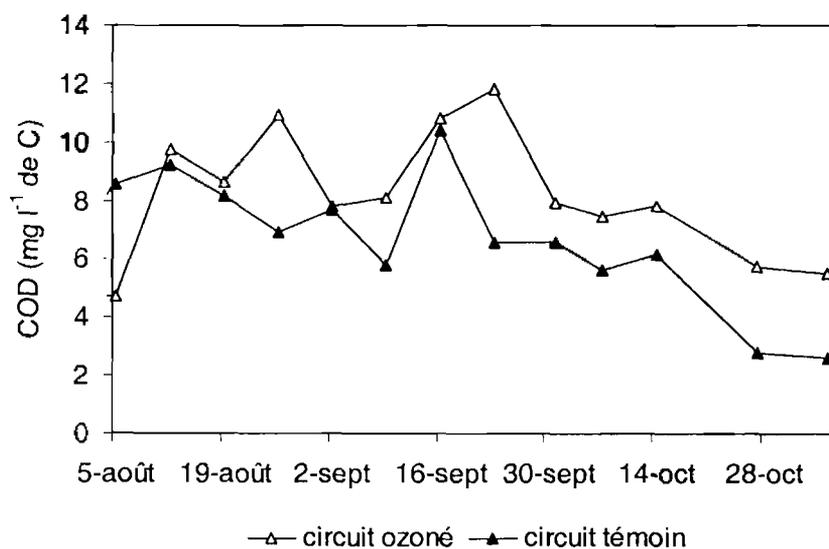


Figure n°6.4. Evolution du COD dans le circuit témoin et dans le circuit ozoné.

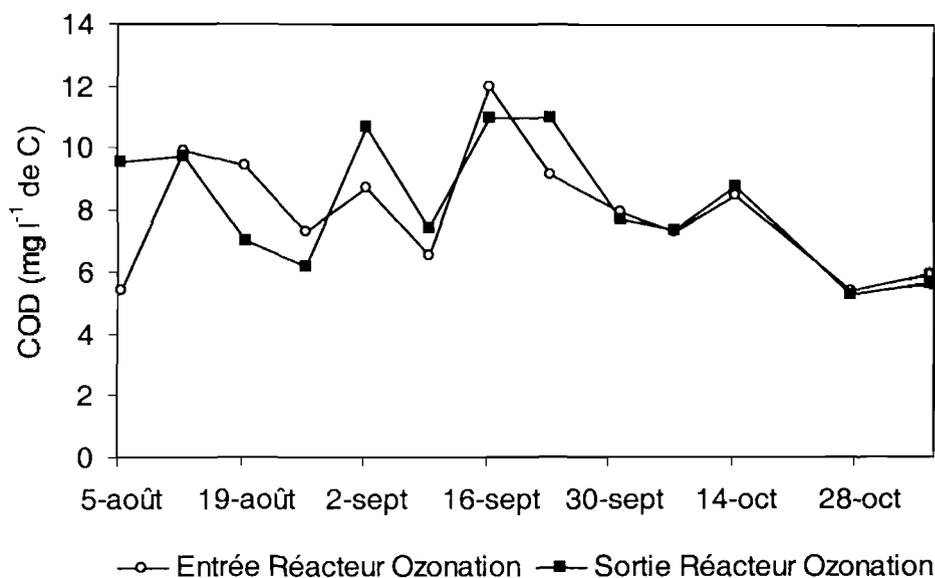


Figure n°6.5. Evolution du COD en entrée et sortie du réacteur d'ozonation.

1.5. Influence des oxydants totaux résiduels sur les substances humiques.

Les figures n°6.6. et 6.7. présentent les mesures d'absorbance à 300 nm (l'absorbance due aux nitrates est déduite de façon à ne prendre en compte que l'absorbance due aux substances humiques) et les mesures de couleur exprimées en unité Platine Cobalt (Pt-Co). Le traitement à l'ozone divise par 2 l'absorbance due aux substances humiques et fait chuter la couleur de l'eau d'élevage de 10 unités Pt-Co. Ceci montre que, si la quantité totale de COD n'est pas diminuée, en revanche les SH ont été oxydées en molécules plus petites, dépourvues de propriétés colorantes.

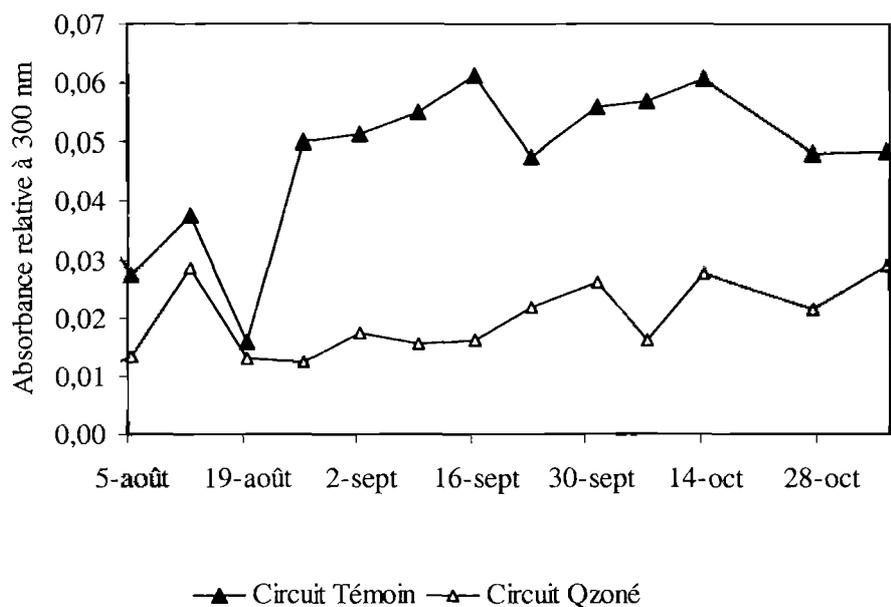


Figure n°6.6. Absorbance à 300 nm due aux SH dans le circuits témoin et le circuit ozoné.

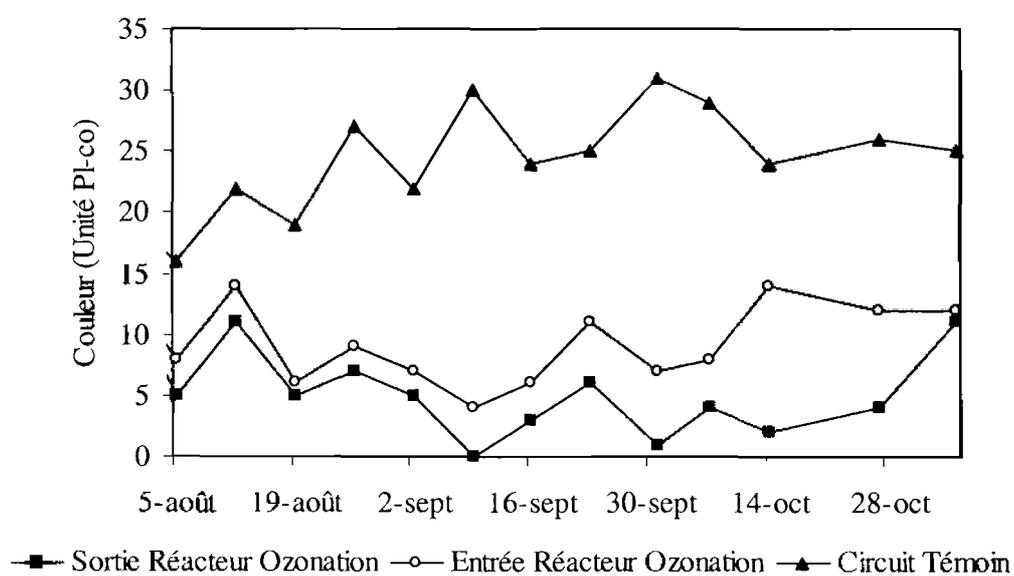


Figure n°6.7. Evolution de la couleur de l'eau dans le circuit témoin et le circuit ozoné.

2. EFFET DES OXYDANTS TOTAUX RESIDUELS SUR LES BACTERIES DU CIRCUIT.

Le tableau n°6.1. présente l'abattement bactérien ainsi que les dénombrements obtenus lors des essais de traitement d'ozonation.

Tableau n°6.1. Influence du traitement d'ozonation sur la flore bactérienne des circuits piscicoles.

	Sans Traitement	Traitement d'ozonation
% d'abattement des bactéries circulante dans le réacteur d'ozonation	Aucun	25 %
Bactéries fixées sur le garnissage du filtre biologique (UFC·g ⁻¹)	$(1,78 \pm 1,16) \cdot 10^5$	$(1,8 \pm 1,2) \cdot 10^5$
Bactéries libérées par le filtre biologique (UFC·ml ⁻¹)	$(1,35 \pm 1,0) \cdot 10^3$	$(8,4 \pm 5,0) \cdot 10^3$

Les différences de concentration en bactéries fixées sur le garnissage du filtre biologique, avant et après la mise en place de l'injection d'ozone, ne sont pas significatives ($F_{4,45} = 0,05$, avec $p = 0,82$). Il en est de même pour les concentrations en bactéries libres, en sortie de filtre biologique, avant et après la mise en place de l'injection d'ozone ($F_{4,45} = 1,107$ avec $p = 0,307$). Un abattement de 25 % des bactéries circulantes entrant dans le filtre biologique n'est donc pas suffisant pour faire baisser le nombre de bactéries fixées dans celui-ci. Il n'y a pas d'effet non plus sur le nombre de bactéries que celui-ci libère dans l'eau d'élevage.

En ce qui concerne la nitrification, les suivis d'azote minéral (ammoniaque, nitrites et nitrates) montrent qu'il n'y a pas de différence entre les concentrations en azote minéral avant et après la mise en place du traitement (fig. n°6.8.). Une concentration en OTR de $0,09 \pm 0,02 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ($M \pm DV$) dans le filtre biologique, ne perturbe pas l'activité nitrifiante des bactéries autotrophes du filtre biologique.

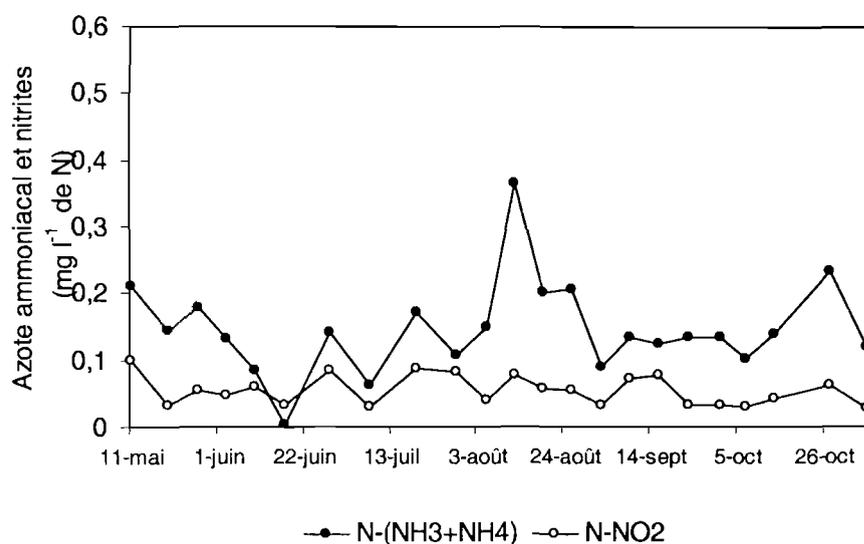


Figure n°6.8. Evolution des concentrations en ammoniacque et en nitrites avant et après la mise en place du traitement d'ozonation (le 3 août).

3. PERFORMANCES ZOOTECHNIQUES DES POISSONS.

Le poids moyen des poissons est évalué toutes les trois semaines par pesée individuelle des poissons des quatre bassins. Nous avons réalisé 5 pesées qui définissent donc 4 périodes d'étude distinctes. Les poids moyens obtenus lors de chaque biométrie sont présentés dans la figure n°6.9.. L'annexe n°6.1. rassemble toutes les données zootechniques correspondant à ces expérimentations. Les figures n°6.10. et n°6.11. montrent l'évolution des taux de croissance journalier (TCJ) et des indices de conversion (IC) mesurés.

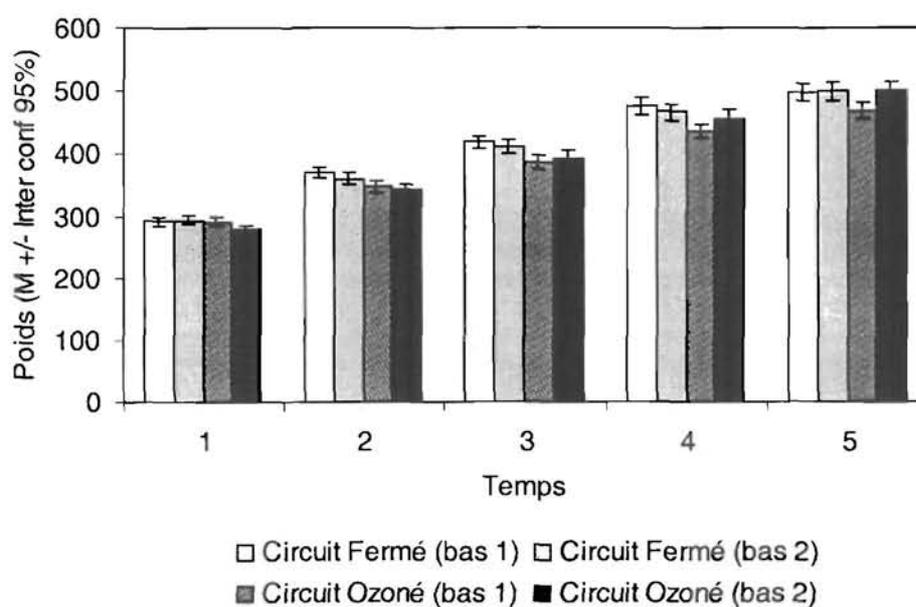


Figure n°6.9. Evolution des poids moyens des poissons dans le circuit témoin et dans le circuit ozoné.

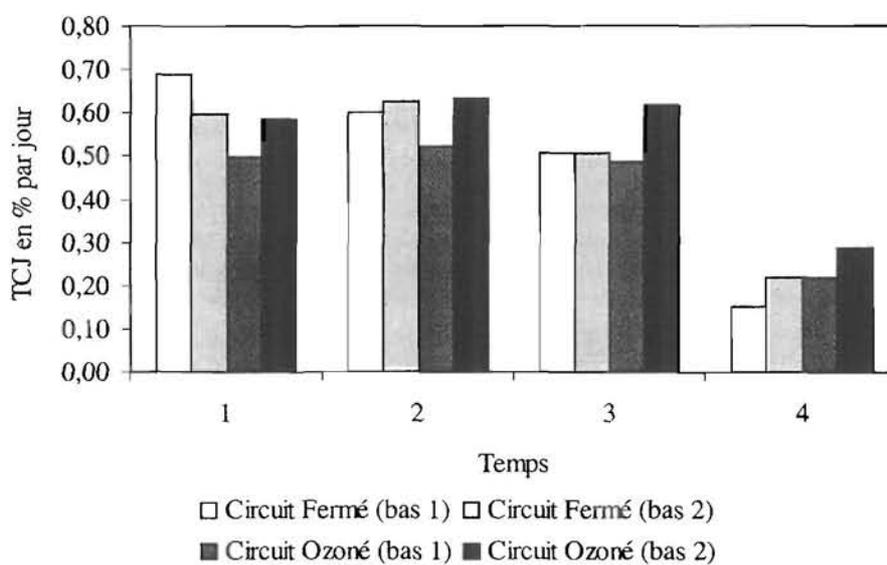


Figure n°6.10. Evolution des taux de croissance journaliers des poissons dans le circuit témoin et dans le circuit ozoné.

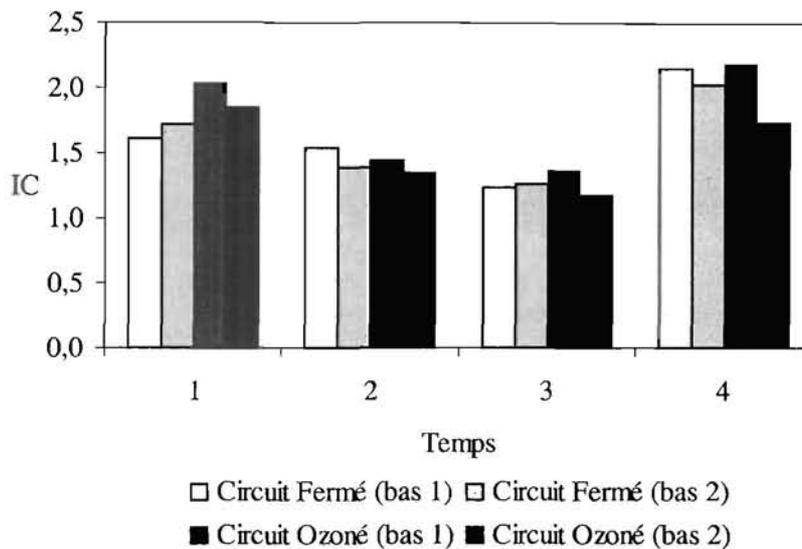


Figure n°6.11. Evolution des indices de conversion alimentaire des poissons dans le circuit témoin et dans le circuit ozoné.

Les tests statistiques montrent qu'il n'y a pas de différence de croissance significative entre les deux circuits recirculés (avec et sans système d'ozonation) pendant toute l'étude. En effet, les deux bassins du circuit recevant le traitement ozonation n'ont pas réagi de la même façon. Dans l'un des bassins, les taux de croissance et les indices de conversion sont meilleurs que ceux des bassins du circuit témoin. Dans le second bassin, les performances sont les mêmes que celles des poissons des bassins du circuit témoin.

En ce qui concerne le traitement ozone, nous n'avons pas observé de troubles du comportement (alimentaire et natatoire) chez les poissons du circuit soumis à l'ozone. Toutefois, les résultats zootechniques (TCJ et IC) montrent que les poissons des 2 bassins du circuit subissant le traitement ozone ne réagissent pas de la même façon. Nous avons donc effectué des prélèvements sur les branchies d'animaux soumis aux eaux ozonées, de façon à voir si les OTR présents dans le circuit perturbaient les poissons.

4. ETUDE DES BRANCHIES DE BAR SOUMIS AU TRAITEMENT D'OZONATION.

Nous avons soumis des bars à trois concentrations en OTR : une concentration dite faible, équivalente à $0,06 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Cl_2 (pendant deux mois d'élevage dans les expérimentations décrites précédemment) et deux doses élevées équivalentes respectivement à

0,6 et 1,9 mg·l⁻¹ de Cl₂ (soit 0,4 et 1,2 mg·l⁻¹ de O₃), afin de mettre en évidence l'effet des fortes concentrations en OTR sur les branchies. Les poissons ont été soumis aux concentrations élevées en OTR (0,6 et 1,9 mg·l⁻¹ de Cl₂) pendant deux heures pour la dose la plus faible, et seulement une heure pour la seconde suite à la mort des poissons. Pour les autres modalités, avant le prélèvement, les poissons ont été tués par le froid.

4.1. Observations des branchies des poissons témoins.

L'apparence histologique (microscopie classique) et l'ultrastructure (microscopie électronique) des branchies des poissons témoins est conforme aux descriptions classiques de branchies (Skimore et Tovell, 1972; Laurent, 1984). Les cellules épithéliales ont des microvillosités d'une épaisseur de 0,1 à 0,2 μm. Elles sont soutenues par une couche opaque aux électrons (fig. n°6.14. a et b).

4.2. Effets des faibles concentrations en oxydants totaux résiduels sur les branchies.

Dans l'expérience où les poissons sont soumis pendant deux mois à des teneurs en OTR de 0,06 mg·l⁻¹ de Cl₂ (0,04 mg·l⁻¹ de O₃), des changements mineurs de l'architecture des lamelles branchiales sont observés. Les lamelles secondaires apparaissent légèrement plus fines que celles des poissons témoins (fig. n°6.12. d). Les coupes semi-fines et les observations en microscopie électronique montrent que les espaces où circule le sang, entre les cellules piliers, sont étendus et présentent des zones non occupées par les érythrocytes (fig. n°6.13. b). A certains endroits, l'épithélium est partiellement détaché de la lamelle basale, constituée des capillaires et des cellules piliers (fig. n°6.13. b). Les observations en microscopie électronique confirment le début de décollement des cellules épithéliales, et montrent qu'elles présentent des microvillosités irrégulières mais lisses et un cytoplasme homogène et finement granuleux (fig. n°6.14 d).

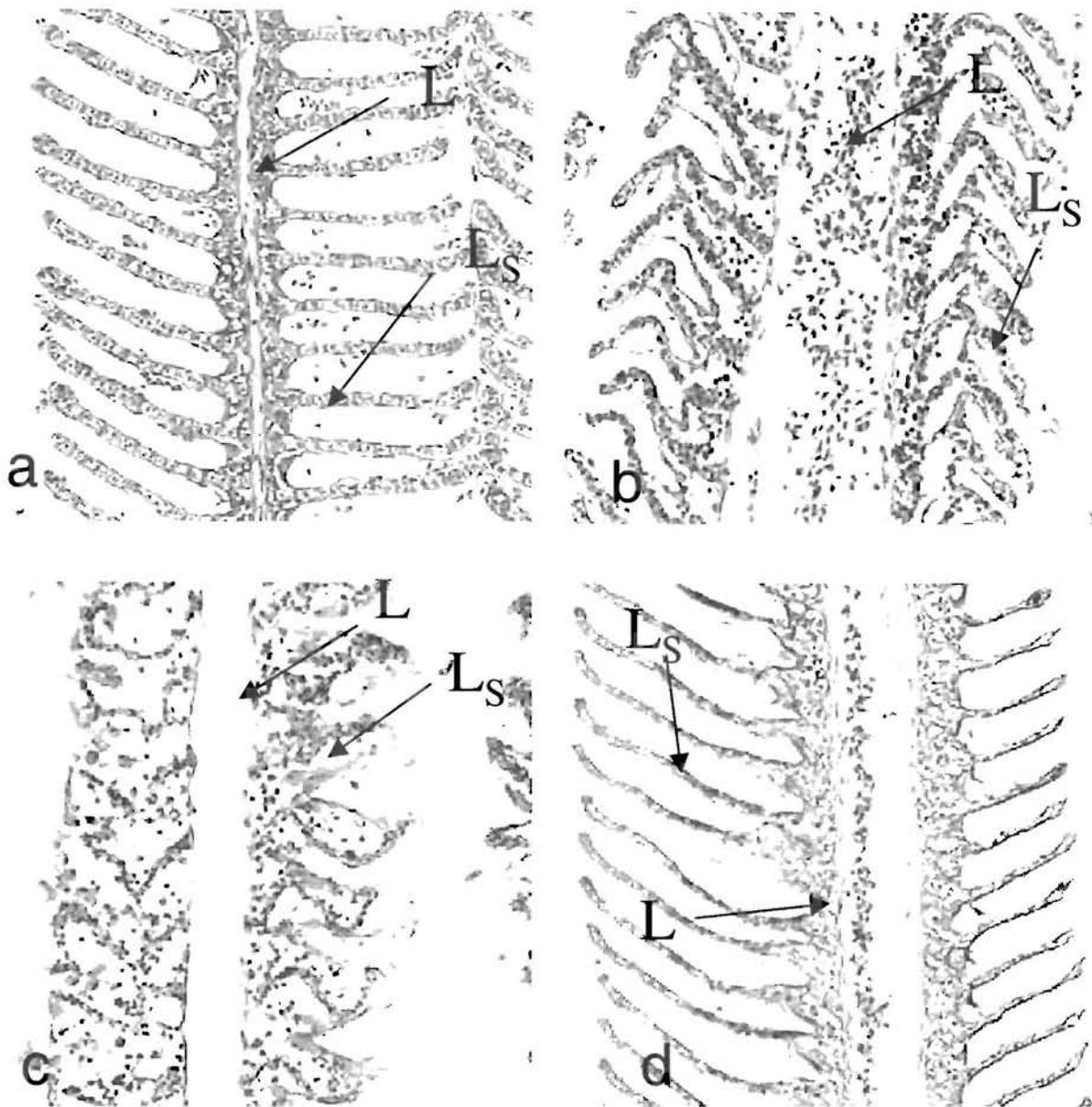


Figure n°6.12. Effet de différentes concentrations en OTR sur les branchies de Loup. Microscopie optique. (x 400) coupe longitudinale de la lamelle primaire.

- a. branchie témoin (pas d'OTR)
- b. traitement: $0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Cl_2
- c. traitement $1,9 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Cl_2
- d. traitement: $0,06 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Cl_2 (pendant deux mois)

avec: L: axe de la lamelle primaire; Ls: lamelle secondaire

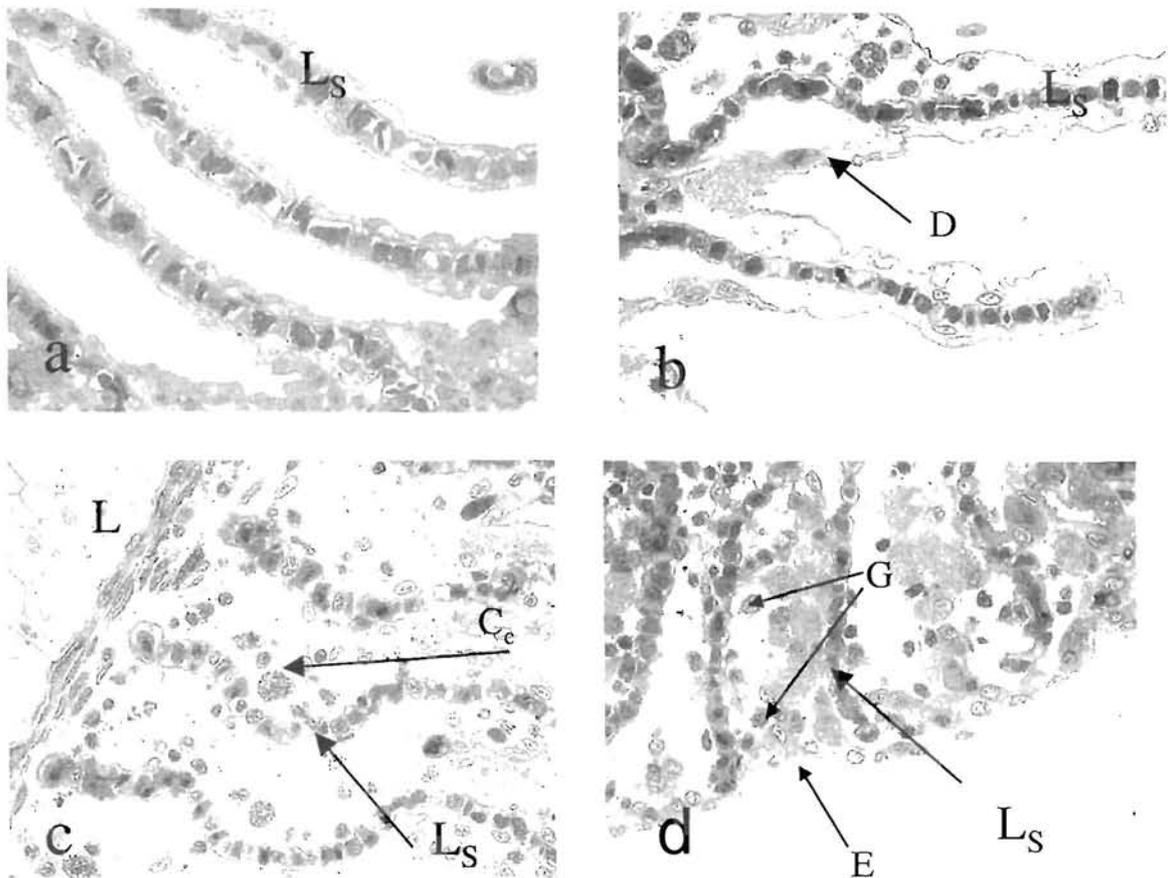
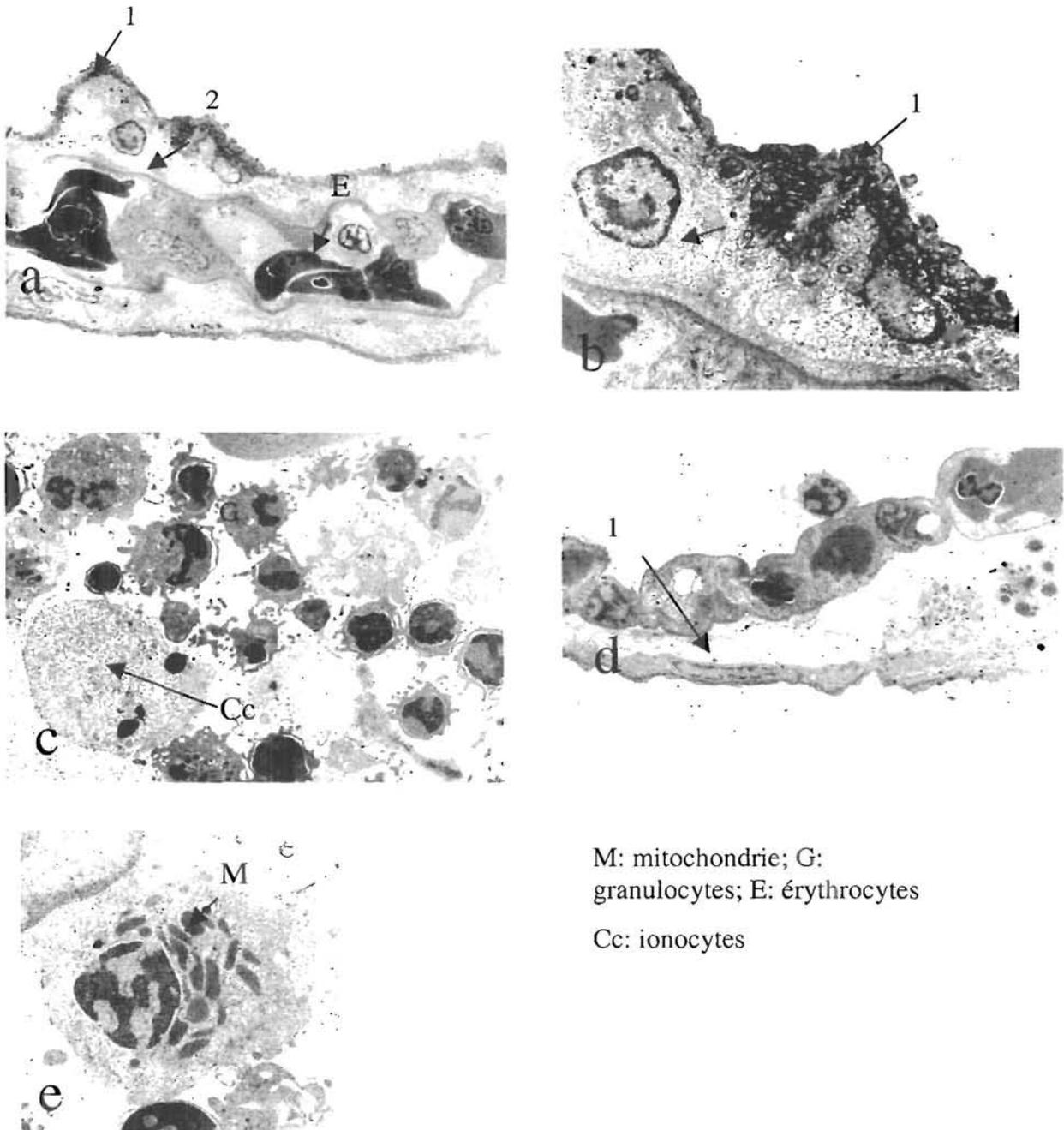


Figure n°6.13. Effet des différentes concentration en OTR sur les branchies de bar, observation des lamelles secondaires. Coupes longitudinales. Coupes semi fines .

- a. témoin (pas d 'OTR) (x300)
- b. traitement $0,06 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Cl_2 , (x1000)
- c. traitement $0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Cl_2 , (x1000)
- d. traitement $1,9 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Cl_2 , (x1000)

D: décollement de l'épithélium, E: épithélium, G: Granulocytes, Ls: lamelle secondaire, Cc: ionocytes.



M: mitochondrie; G:
granulocytes; E: érythrocytes
Cc: ionocytes

Figure n°6.14. Effet des différentes concentrations en OTR sur les branchies de bar, Ultrastructure des lamelles secondaires. Microscopie électronique à balayage.
 a. témoin, (x2500) (1) micro crête, (2) couche opaque aux électrons sous l'épithélium.
 b. témoin (x6000) les micro crêtes sont régulières.
 c. traitement $0,6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de Cl_2 , (x2500) (2) présence de très nombreux granulocytes.
 d. traitement $0,06 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de Cl_2 , (x2500) (1) décollement de l'épithélium, quelques granulocytes
 e. traitement $0,06 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de Cl_2 , (x6000) un ionocytes (1) et ses mitochondries.

4.3. Effets des fortes concentrations en oxydants totaux résiduels sur les branchies.

Les branchies des poissons soumis aux deux concentrations élevées en OTR (0,6 et 1,9 mg·l⁻¹ de Cl₂) présentent des changements beaucoup plus accentués que ceux observés pour des traitements à faible dose. Les observations histologiques montrent que les lamelles secondaires sont courbées et hypertrophiées. Elles présentent des décollements de l'épithélium qui commencent à la base de la lamelle secondaire. Un œdème se développe entre l'épithélium soulevé et la base de la lamelle (fig. n°6.12. b et c). L'extension de l'œdème implique le soulèvement de l'épithélium inter-lamellaire qui reste attaché aux bords de la lamelle primaire. Gonflé de façon importante, l'espace sous-épithélial est envahi par les lymphocytes et les granulocytes. On ne repère plus aucun érythrocyte dans cette zone. Des ionocytes arrachées à la base de la lamelle peuvent aussi se retrouver dans cet espace inter-lamellaire (fig. n°6.13. c et d).

Au niveau ultrastructural, les microvillosités sont dégénérées et la surface des cellules épithéliales est quasiment lisse. De plus, la couche dense aux électrons (présente chez le contrôle) n'est plus nette. De nombreux granulocytes sont infiltrés parmi les cellules épithéliales (fig. n°6.14 c). Aucun changement n'est à signaler au niveau des ionocytes les mitochondries ne sont morphologiquement pas modifiées (fig. n°6.14. e).

5. DISCUSSION.

5.1. Effets du traitement d'ozonation sur la chimie des eaux d'élevage.

La concentration en OTR dans le circuit dépend de la quantité d'ozone injectée, mais aussi de la quantité d'aliment distribuée et dans une moindre mesure de la température de l'eau. L'étude de la relation entre OTR et température ne permet pas de tirer de conclusions nettes, car la corrélation entre ces deux paramètres est faible ($r = -0,6$). Quand la température augmente, les OTR auraient tendance à baisser. En revanche, l'étude portant sur la relation quantité de nourriture distribuée et les OTR montre que la quantité d'OTR, en circuit fermé dépend directement de la quantité d'aliment apportée (fig. n°6.2.).

$$\text{OTR}_{\text{sortie FB}} = -6 \cdot 10^{-5} \cdot Q_{\text{alim}} + 0,1815.$$

Cette relation nous permet de calculer la quantité d'ozone consommée dans le filtre biologique par kg d'aliment : 0,101 g de Cl₂ par g d'aliment, soit 67 gO₃·kg⁻¹ d'aliment. La

quantité d'aliment consommée étant en moyenne de $1,5 \text{ kg}\cdot\text{semaine}^{-1}$, le filtre biologique élimine $100 \text{ gO}_3\cdot\text{semaine}^{-1}$. Les apports d'ozone étant de 170 gO_3 par semaine, il reste donc encore dans le circuit $70 \text{ gO}_3\cdot\text{semaine}^{-1}$ qui se répartissent entre la clarification de l'eau et les OTR rémanents dans les eaux du circuit.

Les travaux de Brazil *et al.*, (1996), réalisés en pisciculture d'eau douce (Truite), avec injection d'ozone se faisant juste avant le filtre biologique, permettent d'évaluer que 10 à $15 \text{ gO}_3\cdot\text{kg}^{-1}$ d'aliment sont suffisants et ne provoquent pas d'accumulation de produits toxiques pour les poissons. Pour des doses plus élevées (de 25 à $45 \text{ gO}_3\cdot\text{kg}^{-1}$ d'aliment), les paramètres physico-chimiques de l'eau sont améliorés, sans effet notable sur les taux de croissance des poissons. A partir de 36 à $39 \text{ gO}_3\cdot\text{kg}^{-1}$ d'aliment, ils observent une augmentation du taux de mortalité des poissons due à l'accumulation de produits toxiques dans les eaux. Il semble donc qu'il soit possible de diminuer les apports d'ozone dans notre système. Le système d'injection de l'ozone peut être amélioré, notamment en injectant l'ozone dans un réacteur de petit volume ou dans une canalisation, de façon à obtenir localement une concentration plus élevée en OTR et peut-être de l'ozone gazeux. Dans notre expérience, le volume du réacteur d'ozonation (300 litres), le débit d'eau et l'injection de l'ozone à travers une grande surface font que ce réacteur est un réacteur parfaitement agité : la concentration mesurée en sortie de réacteur est la concentration la plus élevée en OTR du système. Un meilleur système d'injection, tout en diminuant les doses de traitement, permettra de maintenir une bonne décoloration des eaux et peut être d'obtenir une diminution du COD. Afin de diminuer la concentration en OTR dans les bassins d'élevage, le filtre biologique pourrait être utilisé comme "consommateur d'OTR" à raison de $67 \text{ gO}_3\cdot\text{kg}^{-1}$ d'aliment distribué. Toutefois, à ces doses de traitement ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ d' O_3 pour des concentrations de l'ordre de $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de COD), on est loin des doses stœchiométriques d'une oxydation complète du COD : il ne faut donc pas s'attendre à son élimination.

Cette étude met en évidence que la dose d'ozone doit être adaptée à chaque circuit en fonction : (1) de la quantité d'aliment consommée, (2) du type d'injection, (3) du circuit lui-même (type et efficacité de la filtration mécanique). La quantité d'aliment distribué joue un rôle essentiel : il faut donc envisager de gérer les apports d'ozone en fonction de la prise alimentaire des poissons afin d'éviter ponctuellement (quand les poissons ne s'alimentent pas ou moins) une augmentation des OTR dans le circuit.

5.2. Effet du traitement d'ozonation sur les performances des poissons.

Les résultats dans le circuit ozoné ne sont pas significativement différents de ceux du circuit non ozoné. Cela vient du fait que les deux bassins du circuit soumis au traitement d'ozonation n'ont pas réagi de la même façon. Les poissons de l'un de ces bassins ont eu des taux de croissance journaliers supérieurs de 25 % à ceux du circuit témoin et des indices de conversion alimentaire inférieurs de 15 % à ceux des témoins. Mais le second bassin de ce circuit a eu des performances comparables à celles des poissons du circuit témoin, rendant tous les tests statistiques négatifs. Il semble toutefois que ces phénomènes s'atténuent sur la dernière période, ce qui s'explique par une phase d'adaptation des poissons aux OTR.

Une des hypothèses permettant d'expliquer cette hétérogénéité de réaction des poissons pourrait être que la concentration en OTR dans le circuit est légèrement trop élevée : puisque les poissons de l'un des deux bassins du circuit ozoné n'ont pas réagi (par rapport aux performances des poissons des bassins témoins) à la mise en place du traitement d'ozonation, alors que les meilleures performances de l'autre bassin semblent indiquer que le traitement d'ozonation pourrait avoir un effet très positif.

Certains auteurs (Beretta, 1997) ont décrit des baisses du taux de mortalité dans les élevages soumis à un traitement d'ozonation. N'ayant eu aucune mortalité durant toute l'expérience, aussi bien pour les poissons du circuit témoin et que pour ceux du circuit soumis traitement d'ozonation, nous ne pouvons pas apporter d'information à ce sujet.

5.3. Effet de l'ozone sur les branchies des poissons.

L'étude des branchies des poissons permet d'évaluer l'effet de la concentration en OTR sur les branchies (organe des poissons le plus sensible aux OTR) et d'établir une relation de cause à effet entre la concentration en OTR dans le circuit soumis au traitement d'ozonation, l'état morphologique des branchies et l'absence d'effet positif sur la croissance des poissons de ce circuit.

Jusqu'à présent, peu d'études ont été réalisées sur les effets de l'ozone en milieu marin, c'est à dire sur les effets des OTR. Les expériences que nous avons réalisées montrent qu'un début de réaction au niveau de l'épithélium des lamelles secondaires des branchies de bar apparaît à $0,06 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}_2$. Cet effet s'accroît considérablement quand on expose les poissons à des doses subléthales ($0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}_2$) et léthales ($1,9 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}_2$). D'autres changements apparaissent alors : présence d'un œdème envahi par les lymphocytes et les granulocytes. Des

lésions comparables ont été décrites par Skidmore et Tovell (1972) sur des branchies de truites arc-en-ciel soumises à du sulfate de zinc. Ces auteurs décrivent de plus une occlusion des vaisseaux sanguins des lamelles secondaires, ce qui n'est pas le cas dans nos essais. De même, Speare et *al.*, (1997) montrent que, chez la truite arc-en-ciel et le saumon atlantique, des expositions répétées au formol provoquaient une fusion des lamelles, une hyperplasie et une augmentation de la production de mucus. Par ailleurs, Randi et *al.*, (1996) décrivent, sur les branchies de *Macropsobrycon uruguayanae* exposées à des solutions de cadmium en eau douce, un œdème et un décollement de l'épithélium des lamelles secondaires. A ces phénomènes (observés dans nos essais sur le bar) s'ajoutent une hyperplasie des lamelles primaires et secondaires, un raccourcissement et une télangiectasie des lamelles secondaires.

Dans notre étude, la concentration en ozone utilisée pour le traitement longue durée a été déterminée lors d'essais préliminaire, qui ont montré que $0,04 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ d' O_3 ($0,06 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Cl_2) suffit à dégrader les substances humiques, sans provoquer de troubles du comportement chez les poissons (prise alimentaire et comportement natatoire). Cette concentration est inférieure à celle décrite par Thelu (1987) qui ne constate pas d'effet au niveau histologique sur des poissons exposés à $0,06 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Cl_2 en eau de mer chlorée. A cette concentration, nos essais mettent en évidence les premiers signes d'une réaction au niveau des branchies. Il s'agirait des premières réactions de défense du poisson pour tenter de diminuer l'accès d'un produit toxique au sang (Mallat, 1985). Quand les animaux sont exposés à des doses plus élevées, la réponse est plus importante et va jusqu'à la mort par asphyxie du poisson (Skidmore, 1964), comme nous l'avons aussi observé lors de nos expériences.

L'examen histologique des branchies en microscopie classique, mais surtout en microscopie électronique, permet de détecter très tôt les premiers effets des OTR, même quand le comportement des poissons n'est pas modifié. Il serait intéressant de rechercher la dose maximale supportable par les poissons en répétant ce genre d'observations, mais à des concentrations inférieures à $0,06 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Cl_2 (soit $0,04 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ d' O_3).

6. CONCLUSION.

L'utilisation de l'ozone en circuit recirculé piscicole reste aujourd'hui un procédé en développement. Nous n'avons pas pu montrer de façon certaine que le traitement d'ozonation, en éliminant les substances humiques, améliorerait de façon significative les taux de croissance journaliers et les indices de conversion des poissons. Des études restent encore à faire soit pour éliminer totalement les OTR dans les eaux des bassins d'élevage de circuits recirculés

soumis à un traitement d'ozonation, soit pour déterminer les seuils de risque vis à vis de ces OTR. Cette dernière expérience sera délicate à mettre en œuvre car que les OTR regroupent un grand nombre de produits dont la nature dépend de la qualité de l'eau ozonée. De plus, d'après Crecelius, (1994) même à des doses de traitement faibles, l'ozonation d'hypobromates aboutit à l'accumulation dans le système de bromates, dont la concentration létale pour les poissons est toutefois très élevée (de l'ordre de quelques centaines de $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

**CHAPITRE 7. ESSAI DE MODELISATION DE LA DYNAMIQUE DE CROISSANCE
DES POPULATIONS BACTERIENNES HETEROTROPHES.**

Afin de pouvoir vérifier nos observations et mieux appréhender les différents flux de matière liés aux bactéries hétérotrophes dans nos circuits, nous avons cherché à mettre au point un modèle décrivant l'évolution des bactéries hétérotrophes fixées et libres. Ce modèle est de type déterministe : il est basé sur la consommation du carbone particulaire et dissous par les bactéries hétérotrophes du système, (2) sur l'équilibre entre bactéries libres et fixées essentiellement sur le garnissage du filtre biologique et (3) sur la libération dans le milieu de carbone peu biodégradable.

Le présent chapitre décrit les fondements du modèle (variables d'état, flux, variables forçantes), les expériences (*in situ* ou *in vitro*) et les données bibliographiques qui ont servi à établir la distribution primaire des paramètres du modèle.

1. FONDEMENTS DU MODELE.

De par la quantité de bactéries fixées sur le garnissage du filtre biologique et les échanges qui existent entre bactéries libres et fixées, le filtre biologique est le plus important producteur de bactéries du système. Les observations sur la diminution des apports d'eau neuve et l'évolution des populations bactériennes fixées et libres ont montré que le niveau des populations bactériennes n'est pas corrélé à l'augmentation des nutriments dissous (azoté et carboné) dans le système : l'azote dissous n'est pas limitant et on n'observe pas d'augmentation des bactéries quand le carbone organique dissous (COD) augmente. Les bactéries du filtre biologique semblent utiliser préférentiellement la matière organique piégée sur le garnissage du filtre biologique comme source de carbone pour leur croissance. La quantité de matière organique arrivant jusqu'au filtre biologique dépend de la quantité d'aliment distribué, de l'indice de conversion des poissons et de l'efficacité de la filtration mécanique.

Lorsque les bactéries hétérotrophes meurent, leurs cellules se lysent et leur contenu se libère dans le milieu d'élevage. Des triglycérides vont se condenser en substances humiques et s'accumuler dans le circuit. La figure n°7.1. représente le modèle.

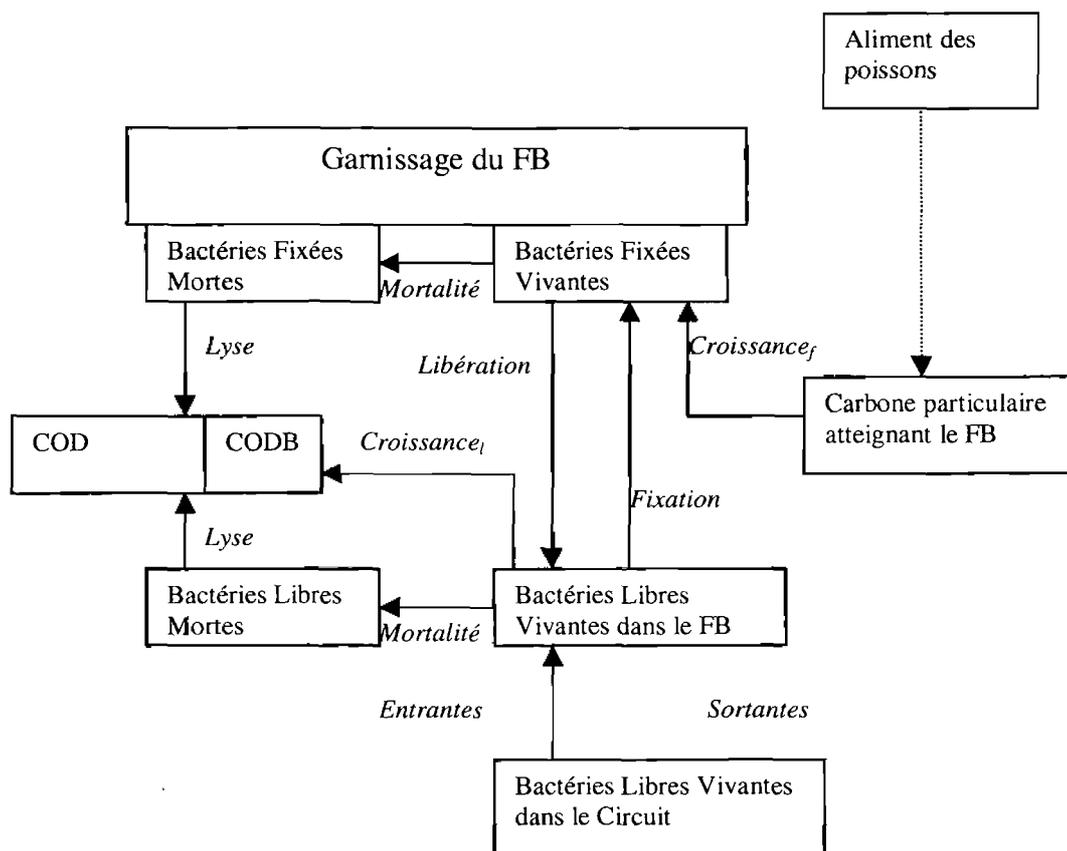


Figure n°7.1. Représentation schématique du modèle.

1.1. Les Variables d'état.

Les variables d'état du modèle sont présentées dans le tableau n°7.1.

Tableau n°7.1. Les variables d'état du modèle bactérien.

Variables d'état	Symbole	Unité
Bactéries libres dans le filtre biologique	BI_{FB}	UFC
Bactéries libres en entrée du filtre biologique	BI_{CIRC}	UFC
Bactéries fixées dans le filtre biologique	Bf_{FB}	UFC
Bactéries libres mortes dans le filtre biologique	Blm_{FB}	UFC
Bactéries fixées mortes dans le filtre biologique	Bfm_{FB}	UFC
Concentration en COD	COD	$g \cdot l^{-1}$
Concentration en COD biodégradable	CODB	$g \cdot l^{-1}$
Quantité de Carbone sur le garnissage du filtre biologique	C	g

1.2. Les différents flux.

Les différents flux, symbolisés par des flèches dans la figure n°7.1. sont présentés dans le tableau n°7.2.. Les paramètres utilisés sont définis dans le tableau n°7.3..

Tableau n°7.2. Les différents flux du modèle bactérien.

Flux	Symboles	Expressions	Unité
Croissance bactéries fixées	Croissance _f	$= Y_{x/s} V_{max} B_{f_{FB}}$	UFC·jour ⁻¹
Croissance bactéries libres	Croissance _l	$= Y_{x/s} V_{max} B_l \text{ CODB}/(ks+\text{CODB})$	
Mortalité bactéries fixées	Mortalité _f	$= k_{mort} B_{f_{FB}}$	
Mortalité bactéries libres	Mortalité _l	$= k_{mort} B_{l_{fb}} + B_{l_{circ}}$	
Libération	Libération	$= k_{det} B_{f_{FB}}$	
Fixation	Fixation	$= k_{fix} B_{l_{fb}}$	
Bactéries libres entrant dans FB	Entrantes	$= d B_{l_{circ}}/V_{fb}$	
Lyse des bactéries libres mortes	Lyse _l	$= k_{lyse} B_{l_{m_{FB}}}$	
Lyse des bactéries fixées mortes	Lyse _f	$= k_{lyse} B_{f_{m_{FB}}}$	
Bactéries libres sortant du FB	Sortantes	$= d B_{l_{fb}}/V_{fb}$	
Consommation du CODB par les bactéries libres	Cons CODB	$= V_{max} (B_{l_{circ}} + B_{l_{FB}}) \text{ CODB} / (Ks+\text{CODB})$	gC·jour ⁻¹
Consommation du C par les bactéries fixées	ConsC	$= V_{max} B_{f_{FB}}$	
Production du COD	Prod COD	$= k_{mort} \cdot k_{lyse} \cdot [B_{l_{fb}} + B_{l_{circ}} + B_{f_{FB}}] \cdot F_{bact/s} \cdot m_{bact}$	
Production du C	Prod C	$= (33 \cdot \text{IC} - 20) 22 \cdot Q_A$	

Tableau n°7.3. Définition des différents paramètres du modèle bactérien.

Définition des paramètres	Symboles	Unité
Bactéries produites par mg de COD (rdt)	$Y_{x/s}$	bactéries·g ⁻¹ de CODB
Vitesse maximale de consommation de CODB	V_{max}	g·bactérie ⁻¹ ·h ⁻¹
Constante d'affinité du CODB pour les bactéries libres	ks	g·l ⁻¹
Taux de mortalité	k_{mort}	jour ⁻¹
Taux de détachement des bactéries fixées	k_{det}	jour ⁻¹
Taux de fixation des bactéries libres sur le garnissage du FB	k_{fix}	jour ⁻¹
Taux de lyse des populations bactériennes mortes	k_{lyse}	jour ⁻¹
Débit d'eau dans le FB	d	m ³ jours ⁻¹
Volume d'eau dans le FB	V_{fb}	m ³
Fraction d'une bactérie que l'on retrouve sous forme de carbone après la lyse bactérienne	$F_{bact/s}$	sans unité
Masse d'une bactérie	m_{bact}	mg

1.3. Les variables forçantes.

Les variables forçantes sont présentées dans le tableau n°7.4..

Tableau n°7.4. Définition des variables forçantes du modèle bactérien.

Variables forçantes	Symbole	Unité
Apports d'eau neuve	EN	m ³ ·jour ⁻¹
Apports d'aliment	Q _A	kg (MB)·jour ⁻¹
Indice de conversion alimentaire des poissons	IC	sans unité

1.4. Les équations d'état.

Les équations d'états sont les suivantes:

$$\partial \text{CODB} / \partial t = \text{Prod COD} - \text{Cons CODB}$$

$$\partial C / \partial t = \text{Prod C} - \text{Cons C}$$

$$\partial B_{FB} / \partial t = \text{Croissance}_f - \text{Mortalité}_f + \text{Fixation} - \text{Libération}$$

$$\partial B_{IB} / \partial t = \text{Fixation} + \text{Libération} + \text{Entrantes} - \text{Sortantes}$$

$$\partial B_{CIRC} / \partial t = \text{Croissance}_l - \text{Mortalité}_l - \text{Sortantes} + \text{Entrantes.}$$

$$\partial B_{m_{FB}} / \partial t = \text{Mortalité}_f - \text{Lyse}_f$$

$$\partial B_{m_{FB}} / \partial t = \text{Mortalité}_l - \text{Lyse}_l$$

1.5. Le mode d'intégration.

Le mode d'intégration choisi est le mode Runge-Kutta (Mesplé et *al.*, 1996).

2. CHOIX DE LA DISTRIBUTION PRIMAIRE DES DIFFERENTS PARAMETRES.

2.1. Paramétrage de la croissance bactérienne.

La croissance des bactéries libres est basée sur l'utilisation du COD. Elle suit une cinétique de type Michaelis-Menten et l'augmentation de bactéries due à la croissance s'exprime par : $\partial(BI) / \partial t = + Y_{x/s} V_{\max} [\text{CODB}] / (k_s + [\text{CODB}]) [B_l]$. La constante de saturation

k_s est difficile à évaluer dans notre système complexe (différents types de bactéries et de sources de C). Nous utiliserons des valeurs données par la bibliographie : $k_s = 0,05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de C (Billen et *al.*, 1992).

Remarque : le taux de croissance μ_{\max} des bactéries est le produit de $Y_{x/s} V_{\max}$.

Pour les bactéries fixées qui utilisent principalement le carbone d'origine particulaire comme source de C, la croissance s'exprime par : $\partial(\text{Bf}_{\text{FB}})/\partial t = + Y_{x/s} V_{\max} [\text{Bf}_{\text{FB}}]$ tant qu'il y a du carbone disponible.

Le taux de croissance ($Y_{x/s} V_{\max}$) n'a été mesuré que pour les bactéries libres dans un milieu de culture constitué par l'eau d'élevage de deux circuits (fig. n°7.2.). Les taux de croissance obtenus sont respectivement $0,115$ et $0,15 \text{ h}^{-1}$. Comme les bactéries libres proviennent des bactéries fixées, nous considérons que les bactéries fixées et libres ont le même taux de croissance maximum de $0,13 \text{ h}^{-1}$ soit $3,12 \text{ jour}^{-1}$.

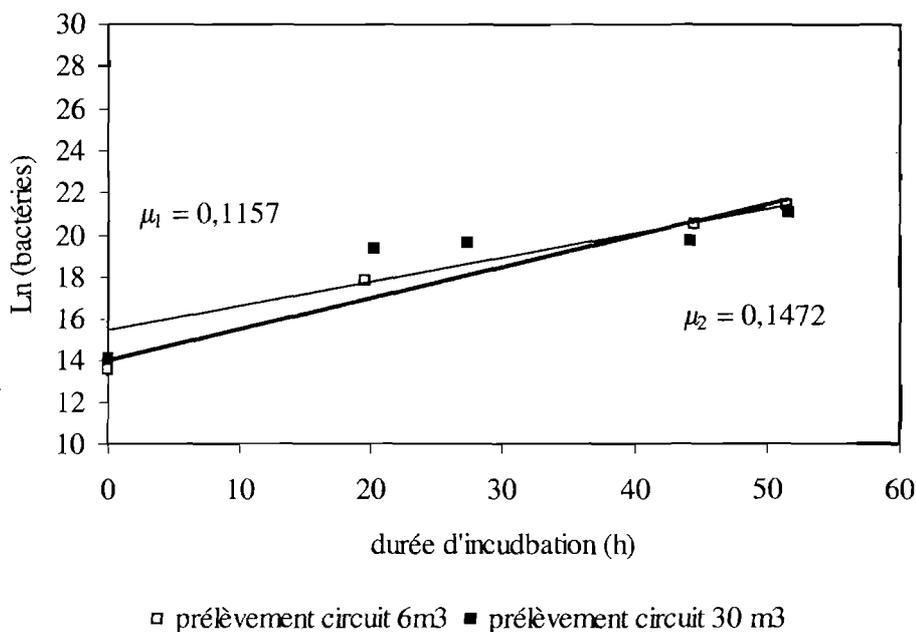


Figure n°7.2. Taux de croissance des bactéries libres.

$Y_{x/s}$ peut être calculé à partir du suivi de l'évolution du COD dans le milieu d'élevage et du nombre de bactéries en suivant la méthode décrite par Servais et *al.*, (1987). Cette méthode est basée sur un bio-essai consistant à suivre la baisse du COD consécutive à son assimilation par un assemblage de bactéries issu du circuit d'élevage (fig. n°7.3.). La figure n°7.4. représente le nombre de bactéries formées en fonction du COD consommé. $Y_{x/s}$ est donc égal à $3 \cdot 10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mg}^{-1}$ de C.

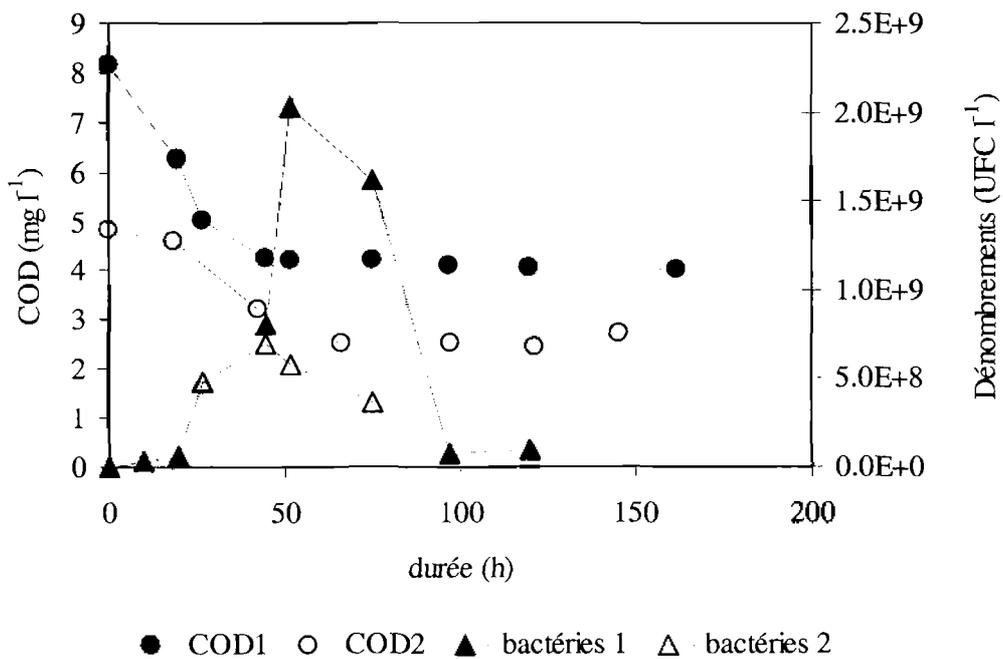


Figure n°7.3. Croissance bactérienne et évolution du COD.

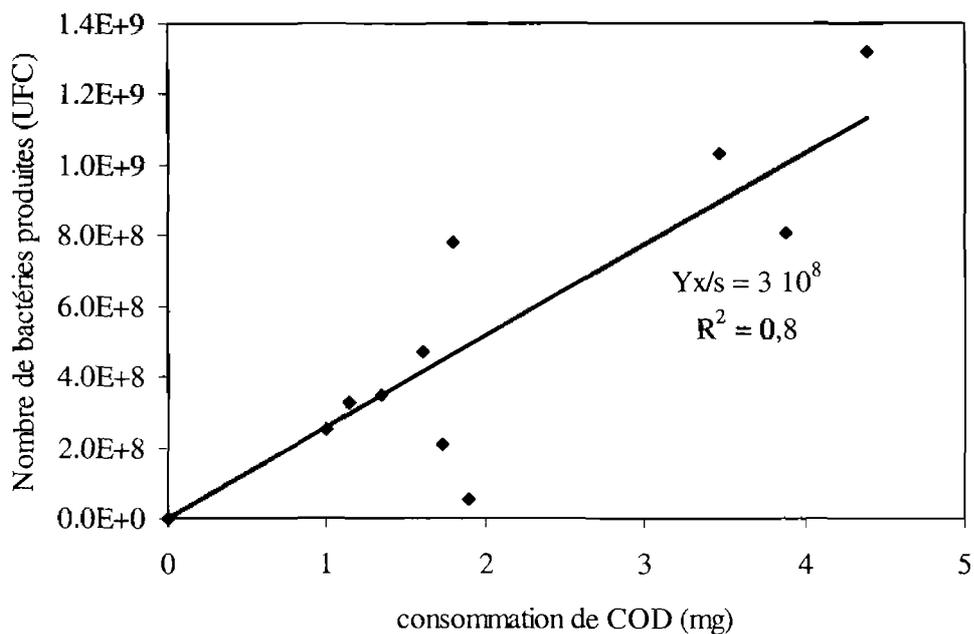


Figure n°7.4. Evaluation du rendement bactérien $Y_{x/s}$.

2.2. Les apports de carbone.

Le carbone organique dissous biodégradable par les bactéries (CODB) a été évalué dans le chapitre 3. Le CODB est une fraction du COD. Cette fraction évolue entre 0,5 et 0,05 en fonction du ratio ingéré sur eau neuve :

$$HS/COD = 0,103 \cdot R + 0,50 \quad (13)$$

En ce qui concerne la quantification du carbone particulaire, nous utilisons la formule mise au point par le CEMAGREF (1983) : $MES_{fèces} = (33 \cdot IC - 20) \cdot A$.

Ces MES contiennent en moyenne 15% de carbone organique. D'autre part nous considérons que la filtration mécanique de nos élevages retient 50% des MES de l'eau (Blancheton, 2000).

La quantité de carbone produite par kg d'aliment ingéré (après filtration mécanique) s'exprime donc par:

Production C = (33·IC-20) $Q_A/100$ ·coefficient de MES éliminées par la filtration mécanique·pourcentage de C dans les fèces

$$\text{soit Production C} = (33 \cdot IC - 20) \cdot 0,5 \cdot 0,05 \cdot Q_A / 100.$$

$$\text{et enfin Production C} = (33 \cdot IC - 20) 0,00025 \cdot Q_A \text{ kg C} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ d'aliment (MS)}$$

Si on veut tenir compte de l'eau contenue dans l'aliment (12%), il faut corriger cette expression, on obtient alors :

$$\text{Production C} = (33 \cdot IC - 20) 0,22 \cdot Q_A \text{ g C} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ d'aliment en matière brute (MB).}$$

Q_A étant la quantité d'aliment distribuée en kg de matière brute par unité de temps (en 1 jour).

La lyse bactérienne libre dans le milieu du carbone organique. Cette production s'exprime par (Bois et al., 1997):

$$\partial[\text{COD}]/\partial t = k_{\text{mort}} \cdot K_{\text{lyse}} \cdot [BI_{\text{FB}} + BI_{\text{CIRC}} + Bf_{\text{FB}}] \cdot F_{\text{bact/s}} \cdot m_{\text{bact}}$$

Les valeurs de différents coefficients seront obtenues à partir de la bibliographie:

$$K_{\text{lyse}} = 0,011 \text{ h}^{-1} \text{ (Bois et al., 1997), soit } K_{\text{lyse}} = 0,264 \text{ jour}^{-1}.$$

$$F_{\text{bact/s}} = 0,46 \text{ (Bois et al., 1997).}$$

$$m_{\text{bact}} = 2 \cdot 10^{-10} \text{ mg (Bois et al., 1997)}$$

k_{mort} dépend de la température : à 24°C, $k_{\text{mort}} = 0,011 \text{ h}^{-1}$ soit 0,264 jour⁻¹ (Billen et al., 1988).

2.3. La consommation du carbone.

La consommation du carbone par les bactéries fixées s'exprime par:

$$\text{ConsC} = \partial C / \partial t = V_{\max} \cdot B_{f_{FB}}$$

Avec: $B_{f_{FB}}$: biomasse bactérienne exprimée en bactérie (UFC)

V_{\max} : vitesse maximale d'utilisation du substrat par bactérie ($\text{mg} \cdot \text{UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

$V_{\max} = \mu_{\max} / Y_{x/s}$

avec $Y_{x/s} = 3 \cdot 10^{11} \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ et $\mu_{\max} = 0,13 \text{ h}^{-1}$

$V_{\max} = 4,3 \cdot 10^{-13} \text{ g} \cdot \text{C} \cdot \text{UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ soit $V_{\max} = 1,04 \cdot 10^{-11} \text{ g} \cdot \text{C} \cdot \text{UFC}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$

La consommation du carbone par les bactéries libres s'exprime par:

$$\text{ConsC} = \partial C / \partial t = V_{\max} \cdot [B_{l_{FB}} + B_{l_{CIRC}}] \text{ CODB} / (\text{CODB} + k_s)$$

avec: V_{\max} : identique à celui des bactéries fixées

$k_s = 0,05 \text{ mgC} \cdot \text{l}^{-1}$, (Billen et al., 1992).

2.4. Les constantes d'équilibre entre les bactéries fixées et les bactéries libres dans le filtre biologique.

La vitesse de passage de l'eau à travers le filtre biologique ne sont pas les mêmes dans les deux circuits expérimentaux que nous allons considérer pour établir notre modèle. Afin de savoir si les taux de détachement et de fixation sont dépendants de la vitesse, nous avons réalisé des essais *in vitro* dans lesquels nous avons mesuré ces taux pour différentes vitesses de passage.

2.4.1. Constante de détachement des bactéries fixées sur le garnissage du filtre biologique.

Afin de pouvoir faire varier les vitesses de passage dans le filtre biologique, nous avons réalisé un petit circuit constitué d'un filtre biologique et d'un réacteur UV, dans lequel l'eau est mise en mouvement par une pompe péristaltique à débit variable (annexe n°7.1). L'eau circulante est de l'eau de mer, stérilisée à chaque passage dans le réacteur U.V. La colonne est remplie avec du garnissage du filtre biologique d'un circuit en fonctionnement et la vitesse est fixée pour un cycle d'une heure. Le nombre de bactéries circulantes et le nombre

de bactéries fixées sur le garnissage sont mesurés respectivement tous les quarts d'heure ainsi qu'en début et en fin d'expérience.

On exprime la variation du nombre de bactéries libres $d([Bl_{FB}])$ en fonction du nombre de bactéries fixées et libres :

$$\frac{d[Bl_{FB}]}{dt} = k_{\text{dét}} [Bf_{FB}] - k_{\text{fix}} [Bl_{FB}]$$

Le réacteur UV abat 100% des bactéries circulantes donc $[Bl_{CIRC}] = 0$.

$$\frac{d[Bl_{FB}]}{dt} = k_{\text{dét}} [Bf_{FB}] \quad \text{d'où} \quad d[Bl_{FB}] = k_{\text{dét}} [Bf_{FB}] dt$$

$$\int_{\text{entrée}}^{\text{sortie}} d[Bl_{FB}] = k_{\text{dét}} [Bf_{FB}] \int_{\text{entrée}}^{\text{sortie}} dt$$

En intégrant, on obtient ainsi :

$$k_{\text{dét}} = \frac{[Bl_{FB}]}{[Bf_{FB}]} \cdot \frac{1}{t}, \text{ avec } t : \text{ le temps de séjour dans le garnissage.}$$

$k_{\text{dét}}$ est ainsi déterminée pour les différentes vitesses entre 0,5 et 10 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Le tableau n°7.5. présente les dénombrements obtenus pour chacune des vitesses de passage testées et le coefficient de détachement des bactéries qui lui correspond. La figure n°7.5. illustre ce tableau. en présentant, pour chaque vitesse, le rapport entre $[Bl_{FB}]/[Bf_{FB}]$ et $k_{\text{dét}}$. Le coefficient est donc indépendant de la vitesse de passage et est égal à $0,76 \pm 0,1 \text{ h}^{-1}$ ($M \pm DS$).

tableau n°7.5. Détermination des constantes de détachement.

Vitesse de passage ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$)	Temps de séjour (s)	Bf _{FB} (UFC)	Bl _{FB} (UFC)	$[Bl_{FB}]/[Bf_{FB}]$ sans dimension	$k_{\text{dét}}$ (h^{-1})
0,57	175	$1,65 \cdot 10^{+8}$	$5,60 \cdot 10^{+5}$	$3,39 \cdot 10^{-3}$	0,07
1,14	88	$7,17 \cdot 10^{+6}$	$1,33 \cdot 10^{+5}$	$1,85 \cdot 10^{-2}$	0,76
1,56	64	$6,42 \cdot 10^{+7}$	$7,59 \cdot 10^{+5}$	$1,18 \cdot 10^{-2}$	0,66
3,42	29	$4,70 \cdot 10^{+7}$	$3,46 \cdot 10^{+5}$	$7,36 \cdot 10^{-3}$	0,91
6,03	17	$3,52 \cdot 10^{+7}$	$1,22 \cdot 10^{+5}$	$3,47 \cdot 10^{-3}$	0,75
8,14	12	$8,19 \cdot 10^{+7}$	$2,38 \cdot 10^{+5}$	$2,90 \cdot 10^{-3}$	0,85
8,9	11	$1,94 \cdot 10^{+7}$	$3,89 \cdot 10^{+4}$	$2,01 \cdot 10^{-3}$	0,64

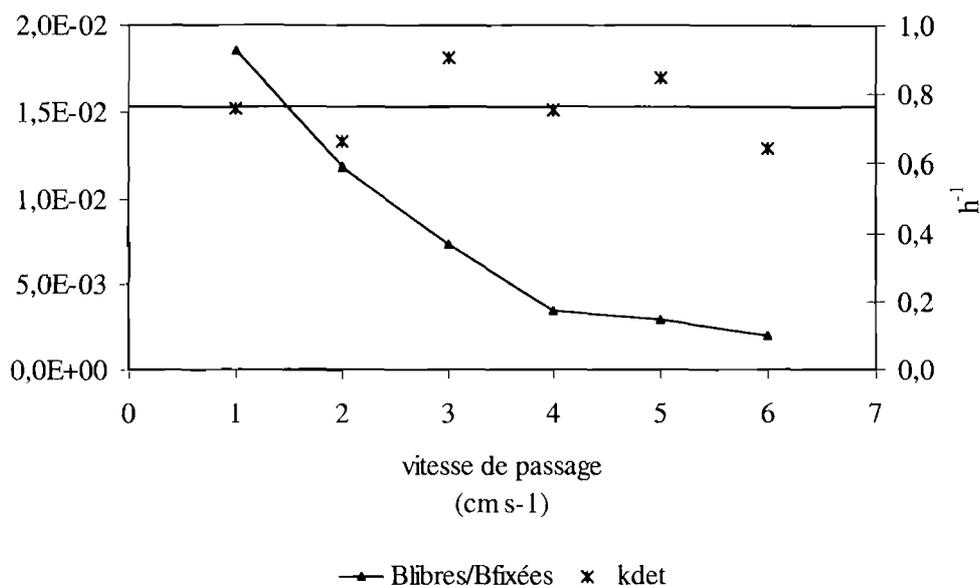


Figure n°7.5. Détermination de la constante de détachement dans le filtre biologique.

2.4.2. La fixation des bactéries libres sur le garnissage du filtre biologique.

L'annexe n°7.2. présente le schéma du circuit utilisé. L'eau circulante provient d'un circuit d'élevage en fonctionnement et le garnissage est dépourvu de bactéries fixées. Le nombre de bactéries circulantes et le nombre de bactéries fixées sur le garnissage sont mesurés respectivement tous les quarts d'heure et en début et en fin d'expérience.

On exprime la variation du nombre de bactéries libres $d[Bl_{FB}]$ en fonction du nombre de bactéries fixées et libres:

$$\frac{d[Bl_{FB}]}{dt} = k_{\text{dét}} \cdot [Bf_{FB}] - k_{\text{fix}} \cdot [Bl_{FB}]$$

Le garnissage étant préalablement autoclavé (15min à 120°C), on considère que $[Bf_{FB}]$ est nulle.

$$\text{Par conséquent : } \int_{\text{entrée}}^{\text{sortie}} d[Bl_{FB}] = -k_{\text{fix}} \cdot [Bl_{FB}] \int_{\text{entrée}}^{\text{sortie}} dt$$

$$-k_{\text{fix}} \cdot \int_{\text{entrée}}^{\text{sortie}} dt = \int_{\text{entrée}}^{\text{sortie}} \frac{d[Bl_{FB}]}{[Bl_{FB}]}$$

Après intégration entre l'entrée et la sortie de la colonne, on obtient alors :

$$k_{\text{fix}} = - \frac{\ln \frac{[Bl_{FB}]}{[Bl_{CIRC}]}}{t} \quad \text{avec } t : \text{ le temps de séjour dans le garnissage.}$$

Le tableau n°7.6. présente les dénombrements obtenus pour chacune des vitesses de passage testées et le coefficient de fixation des bactéries sur le garnissage qui lui correspond.

tableau n°7.6. Détermination des constantes de fixation.

Vitesse de passage (cm s ⁻¹)	Temps de séjour (s)	Bl _{CIRC} (UFC)	Bl _{FB} (UFC)	[Bl _{FB}]/[Bl _{CIRC}] sans dimension	k _{fix} (h ⁻¹)
1,1	91	8,00 10 ⁺³	4,00 10 ⁺³	5,00 10 ⁻¹	27,4
4,6	22	1,65 10 ⁺⁵	1,30 10 ⁺⁵	7,88 10 ⁻¹	39,5
5,75	17	4,68 10 ⁺⁴	3,90 10 ⁺⁴	8,34 10 ⁻¹	37,5

Le nombre de vitesses testées est insuffisant pour permettre d'affirmer que le coefficient dépend ou non de la vitesse de passage. Il est probablement de l'ordre de 38,5 h⁻¹, et de 27 h⁻¹ à 1 cm·s⁻¹, mais ceci doit être confirmé.

Ces essais ont montré que les valeurs des coefficients de fixation et de détachement des bactéries semblent constantes dans la gamme de vitesse que nous avons testée. Ces valeurs seront donc communes aux deux circuits expérimentaux de 24 et de 6 m³. Les résultats obtenus directement à partir des mesures réalisées sur le circuit expérimental de 6 m³ donnent des constantes suivantes : k_{fix} = 8,45 h⁻¹ et k_{det} = 0,067 h⁻¹. Ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues lors des essais *in vitro*. Nous les avons choisies comme valeurs initiales des coefficients de fixation et de détachement.

3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.

3.1. Le modèle bactérien.

La configuration de base du modèle bactérien a été réalisée en utilisant le logiciel Stella. Dans un deuxième temps, pour éviter les limitations inhérentes à Stella (durée d'intégration et calibration des paramètres), nous avons utilisé le logiciel SENECA.

Afin de simplifier le problème et dans la mesure où l'essentiel de l'activité bactérienne a lieu dans le filtre biologique, le circuit est considéré comme étant constitué de deux compartiments principaux qui sont le filtre biologique d'une part et le reste du circuit d'autre part. Le filtre biologique est un compartiment dans lequel les apports en bactéries libres et en carbone organique biodégradable (dissous et particulaire) sont définis comme des variables forçantes. La calibration des paramètres du modèle est délicate car la plupart d'entre eux sont liés (par exemple les coefficients de fixation et de détachement, le taux de croissance, la mortalité...) et elle n'a pas abouti : les valeurs simulées suivent l'évolution générale des valeurs observées, mais l'amplitude des variations est insuffisantes.

La raison en est vraisemblablement que les rendements d'utilisation du carbone organique et les taux de croissance ont été évalués pour des bactéries libres consommant du carbone dissous, alors que le carbone particulaire est la source principale de carbone. Il serait donc souhaitable de les réévaluer pour les bactéries consommant du carbone particulaire.

De plus, notre technique de récupération des bactéries fixées sur le garnissage du filtre biologique ne permet pas de récupérer l'intégralité de celles-ci. Il est probable que le taux de récupération des bactéries fixées est fonction de la concentration de ces bactéries sur le garnissage. Il faudrait donc affecter au taux de récupération un coefficient qui serait une fonction de la concentration en bactéries.

Des expériences *in vitro* sont donc nécessaires pour caractériser la consommation de carbone particulaire par les bactéries fixées et estimer le taux de récupération des bactéries fixées sur le garnissage lors de comptages.

3.2. Le modèle général.

Parallèlement, la programmation du modèle générale à été réalisée en utilisant le logiciel LABVIEW. Ce modèle permettra de décrire tous les flux de matière dans un système recirculé (croissance des poissons, cycle de l'azote et du carbone...). La phase de calibration des différents paramètres sera réalisée, pour chacun des sous modèles, en utilisant SENECA. Les valeurs calibrées de ces paramètres seront ensuite injectées dans le modèle général sous LABVIEW.

CONCLUSION GENERALE

Les travaux que nous avons réalisés sur les élevages piscicoles en circuit fermé ont permis dans un premier temps de caractériser chimiquement les eaux d'élevage, et plus particulièrement, d'appréhender le cycle du carbone. La coloration brun jaune dans les eaux d'élevage a permis de mettre en évidence l'accumulation de substances humiques. Ces substances humiques sont des molécules à longue chaîne carbonée issues de la condensation des acides gras des triglycérides présents dans l'eau, sous l'action du rayonnement UV (Harvey *et al.*, 1983). Elles sont difficilement biodégradables par les bactéries, sauf en l'absence de tout autre type de substrat. Les substances humiques isolées dans les eaux des circuits d'élevage piscicoles ont la particularité d'être riches en azote, ce qui est dû à la concentration élevée en ammoniacque, nitrites et nitrates dans les eaux d'élevage. Dans nos circuits, les triglycérides peuvent avoir trois origines : la lyse des cellules bactériennes présentes dans le circuit, les farines de poissons contenues dans l'aliment et les fèces des poissons.

Les autres produits d'accumulation dans les eaux d'élevage piscicoles sont les nitrates pour le cycle de l'azote et les phosphates pour le phosphore. Les concentrations en nitrates et en substances humiques sont linéairement proportionnelles à la fermeture des circuits d'élevage (la fermeture est exprimée comme le rapport entre l'aliment ingéré et les apports d'eau neuve réalisés sur une période donnée). On retrouve dans les eaux d'élevage 73 % de l'azote apporté au système sous forme de nitrates et 1 % du carbone apporté par l'aliment sous forme de substances humiques. Bien qu'il existe assez peu de références en aquaculture sur le cycle du carbone, il semble toutefois que les eaux de nos circuits avec des biomasses comprises entre 5 et 10 kg de poissons par m³, soient assez pauvres en carbone comparativement aux eaux d'élevage en eau douce et d'aquarium. Concernant les phosphates, il semble que la régulation du pH dans des eaux riches en calcium (ce qui est le cas des eaux de mer : 400 mg·l⁻¹) et les caractéristiques de la filtration mécanique jouent un rôle important dans la régulation de leur concentration. Dans notre cas, nous avons observé une relation de type logarithmique entre la concentration en phosphates et les apports d'eau neuve et d'aliment, avec une concentration qui ne dépasse pas 6 mg·l⁻¹ de P-PO₄. Ceci correspond à 10 % des apports de phosphore dans le système. En circuit ouvert, Lemarié *et al.*, (1998) ont retrouvé dans les eaux de rejet, 60 % du phosphore apporté.

Les suivis de croissance du bar à différents degrés de fermeture du système d'élevage, ont mis en évidence une diminution de l'ordre de 10% du taux de croissance journalier entre des poissons élevés en circuit recirculé très ouvert d'une part et en circuit fermé d'autre part. La comparaison des taux de croissance obtenus pour les circuits les plus fermés (au moins

jusqu'à des fermetures de 3 à 4 kg·m⁻³) ne met pas en évidence de nouvelles baisses du taux de croissance.

Les substances humiques peuvent être oxydées et partiellement détruites par des traitements d'ozonation. Afin de comparer la croissance des poissons dans des circuits avec et sans substances humiques, des essais d'ozonation ont été effectués sur des circuits très fermés (3 kg·m⁻³). Ces essais d'ozonation n'ont pas permis de mettre en évidence un effet du traitement d'ozonation sur les performances des poissons. Toutefois, l'étude des branchies des poissons du circuit soumis au traitement ozone montre que la concentration en oxydant résiduel dans les eaux est trop forte et provoque un début de réaction de défense chez les poissons, qui pourrait expliquer l'absence d'amélioration du taux de croissance. En fait, seule une véritable expérience d'écotolérance pourra montrer si les substances humiques ont un effet négatif sur la croissance des poissons. Quoiqu'il en soit, la baisse du taux de croissance n'est que de 10 % par rapport à celui qu'auraient ces poissons en circuit recirculés très ouvert. Cette baisse n'est pas très importante par rapport aux avantages qu'apporte une réduction aussi importante des apports d'eau neuve au circuit.

Dans un second temps, nous avons étudié les populations bactériennes hétérotrophes dans les circuits recirculés piscicoles, avec pour objectif de caractériser la flore dominante afin de savoir si elle est stable dans le temps et de connaître les compartiments importants vis à vis de la régulation de ces populations. Ces essais nous ont permis de mettre en évidence que dans un circuit de type industriel (forte biomasse, entre 70 et 80 kg de poissons par m³ d'eau, dimensionnement du circuit d'élevage et choix technologiques comparables à ceux qui sont faits dans le secteur industriel), pour un même mode de fonctionnement (apport d'eau neuve, distribution d'aliment, comportement alimentaire des poissons), les populations bactériennes hétérotrophes sont stables en nombre et en type de bactéries. On retrouve trois niveaux bactériens dans le circuit : le niveau le plus faible est en sortie du réacteur Ultra Violet ; le niveau intermédiaire se situe en entrée du filtre biologique et le niveau le plus élevé se situe entre la sortie du filtre biologique et l'entrée du réacteur Ultra Violet. En effet, le nombre de bactéries libres est quasiment constant entre la sortie du filtre biologique, les bassins d'élevage, le filtre mécanique et l'entrée du réacteur Ultra Violet. Le filtre biologique apparaît ainsi comme le principal producteur de bactéries hétérotrophes circulantes du circuit piscicole. Les bactéries libres proviennent des bactéries fixées sur tous les supports du circuit et principalement le garnissage du filtre biologique. Ceci est confirmé par le fait que les populations fixées contiennent tous les genres bactériens que nous avons isolés : *Pseudomonas*, *Oceanospirillum*, *Marinobacter*, *Paracoccus*, *Erythrobacter*, *Vibrio* et

Aeromonas. Ces genres sont typiques des environnements marins ; les caractéristiques du milieu d'élevage n'ont pas sélectionné une flore bactérienne particulière. Dans ce circuit pilote, la fermeture du circuit a entraîné une augmentation du nombre de bactéries libres et fixées dans le circuit. Des essais, en circuits expérimentaux de petite taille, parfaitement contrôlés, ont montré que l'augmentation des nutriments dissous dans les eaux d'élevage ne provoquait pas d'augmentation du nombre de bactéries libres ou fixées. Il semble donc que les populations fixées sur le garnissage du filtre biologique utilisent préférentiellement le carbone contenu dans les matières en suspension s'accumulant dans le filtre biologique, plutôt que le carbone organique dissous de l'eau d'élevage, essentiellement constitué par les substances humiques.

Les populations de bactéries hétérotrophes présentent des aspects à la fois positifs et négatifs dans les systèmes recyclés:

- D'une part, elles transforment partiellement la matière particulaire en matières dissoutes plus difficiles à éliminer en consommant de l'oxygène, en contribuant à baisser le pH et en produisant du CO₂ et des substances humiques;
- D'autre part, elles constituent un écosystème bactérien stable, susceptible d'être favorable aux poissons en élevage et peu propice à l'introduction de pathogènes dans le milieu d'élevage.

Il est donc souhaitable de conserver cette population tout en contrôlant son développement et son orientation.

Le travail effectué dans le cadre de cette thèse met en évidence le rôle prédominant que jouent les matières particulaires sur le développement quantitatif et qualitatif des bactéries hétérotrophes. Pour limiter leur nombre et éviter que ne se développe de manière prédominante des populations de *Vibrio* (potentiellement pathogènes), les principaux paramètres de gestion du système d'élevage sont (1) la filtration mécanique (aujourd'hui limitée autour de 50 µm pour des raisons d'ordre technologique); (2) la limitation du gaspillage (utilisation de self feeder et protection des tiges tactiles); (3) l'augmentation des performances des pièges à particules (qui récupèrent aujourd'hui environ 30 % des fèces de bar) et (4) le maintien d'indices de conversion alimentaire corrects chez les poissons (paramètres environnementaux adaptés).

Les thèmes de recherche les plus prometteurs pour améliorer les systèmes d'élevage sont les suivants :

- une étude plus détaillée des relations entre le carbone particulaire et les bactéries hétérotrophes fixées permettra d'obtenir des taux de croissance bactériens et des

rendements (bactéries/substrat) spécifiques du milieu recyclé. Cette étude permettra d'affiner la modélisation de la dynamique des populations bactériennes hétérotrophes dans les circuits piscicoles;

- si les premiers essais de traitements d'ozonation n'ont pas donné les résultats escomptés aux niveaux des taux de croissance des poissons et du contrôle des populations bactériennes, il a efficacement dégradé les substances humiques. De nombreuses améliorations peuvent être apportées, d'une part au niveau de la concentration en oxydants résiduels et d'autre part de l'amélioration du système d'injection de l'ozone, afin de pouvoir exploiter toutes les possibilités offertes par l'utilisation de cet oxydant (désinfection, décoloration, coagulation des fines particules).
- des essais d'écotoxicité sur les produits d'accumulation dans les circuits : nitrates, phosphates et substances humiques, permettront de déterminer exactement le niveau de fermeture à partir duquel les performances zootechniques des poissons peuvent être affectées. Au pisciculteur de choisir, en fonction de critères économiques, le meilleur compromis entre le degré de sophistication du système d'élevage et la productivité pour chacune des espèces de poissons;
- des études sont nécessaires pour comprendre et acquérir les moyens d'exploiter la capacité potentielle des populations bactériennes hétérotrophes à jouer le rôle d'écran vis à vis de l'introduction de pathogènes. Elles donneront les clés pour la gestion et le développement d'une flore bactérienne hétérotrophe ayant soit des propriétés probiotiques vis à vis des poissons, soit des effets antagonistes vis à vis des bactéries pathogènes des poissons.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alanärä, A., 1998. New perspectives on feed budgets for cultured fish. In : Aquaculture and water : fish culture, shellfish culture and water usage, Abstracts of contributions presented at the International Conference, Aquaculture Europe '98, Bordeaux, France, October 7-10, 1998. Oostende, Belgium, European Aquaculture Society, Special publication n°26 : 10-11.
- Alexander, 1978. Introduction to soil microbiology. Second ed.-Wiley Eastern LTD. New Delhi, 467 p.
- Almgren, T., Josefsson, B., Nyquist, G., 1975. A fluorescence method for studies of spent sulfite liquor and humic substances in sea water. *Analytica chimica acta*, 78 : 411-422.
- Amador, J.A., Milne, P., Moore, C., Zika, R., 1990. Extraction of chromophoric humic substances from seawater. *Marine chemistry* 29 : 1-17.
- Amblard C., Bourdier, G., Carrias, J.F., Maurin, N., Quiblier, C., 1998. Structure et fonctionnement des communautés microbiennes dans un réservoir d'eau potable. Groupement des Protistologues de Langues Française, XXXVIème réunion annuelle, Tunis, 21-25 mai 1998.
- Aminot, A., Chaussepied, M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO BNDO (Ed), Brest, FR, 395 p.
- Angehrn, M., 1984. Ultraviolet disinfection of water. *Aqua*, 2 : 109-115.
- Barnabé, G., 1972. Contribution à l'étude de la biologie du Loup (*Dicentrarchus labrax*) de la région de Sète. Montpellier. USTL. Thèse de doctorat. 3^e cycle. 97 p.
- Beretta, P., 1999. Ozone for Steptococcosis' disinfection in fishfarming. *Bollettino Societa Italiana di Pathologia Ittica*, 11 (26) : 33-39.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994. Ninth Edition. (Ed.) Williams&Wilkins.
- Bianchi, M., Perfectini, J., Bianchi, A., 1992. Marine heterotrophic bacteria associated with enrichment culture of nitrifying bacteria planned for closed aquaculture systems. *Aquatic living resources*, 5 : 137-144.
- Bianchi, M., Van Wambeke, F., 1982. Dynamic of bacterial communities of nitrogen enrichment sea-water : short term experiments. Actes du colloque international n°331 sur la bactériologie marine organisé dans le cadre des colloques internationaux du centre national de la recherche scientifique à Marseille du 17-19 mai 1982 : 61-69.

- Billard, R., 1998. Aquaculture production system : a continuum from culture in open waters to rearing in closed systems. Salt marshes and aquaculture : Sustainable activity for conservation and exploitation of coastal wetland and salt marshes. Actes de Colloques IFREMER.
- Billen, G., Servais P., Bouillot P., Ventresque C., 1992. Functioning of biological filters used in drinking-water treatment- The Chabrol model. Journal of water SRT-Aqua, 41 : 231-241.
- Billen, G., Servais, P., Fontigny, A., 1988. Growth and mortality in bacterial population dynamics of aquatic environments. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol., 31 : 173-183.
- Blancheton, J.P. Canaguier, B., 1995. Bacteria and particulate materials in recirculating seabass (*Dicentrarchus labrax*) production system. Aquaculture, 133 : 215-224.
- Blancheton, J.P., 2000. Developments in recirculation systems for Mediterranean fish species. Aquacultural Engineering, 22 : 17-31.
- Blogoslawski, W.J., Perez, C., Hitchens, P., 1992. Ozone treatment of seawater to control vibriosis in mariculture of penaeid shrimp, *Peneus vannameii*. In 3th International symposium on The Use of Ozone in Aquatic Systems, September 8-11, Greenwich Connecticut, USA. Water J. Blogoslawski (Ed), The international ozone association, Stamford, USA, 131-138.
- Bois, F.Y., Fahmy T., Block, J.C., Gatel, D., 1997. Dynamic modelling of bacteria in a pilot drinking-water distribution system. Water Research, 31 (12) : 3146-3156.
- Bôlter M., 1982. Submodels of a brackish water environment. I. Temperature and microbial activity. Ecological modelling, 17 : 311-318.
- Bott, T.R., Miller, P.C., 1983. Mechanism of Biofilm Formation on Aluminium Tubes. Journal of chemical technology and biotechnology, 33B : 177-184.
- Bovendeur, J., Eding, E.H., Henken, A.M., 1987. Design and performance of a water recirculating system for high density culture of African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchel, 1822). Aquaculture, 63 : 329-353.
- Bowen, B.D., Epstein, N., 1979. Fine particle deposition in smooth parallel-plate channels. Journal of Colloid and Interface Science, 72 : 81-97.
- Brazil, B.L., Summerfelt, S.T., Libey, G.S., 1996. Application of ozone to recirculating aquaculture systems. In : Aquacultural Engineering Society Proceeding II : successes and failures in commercial recirculating aquaculture., NRAES-98, 2 : 373-389.
- Cabe, M., 1968. Techniques histologiques. Masson (Ed), Paris VI, FR, 1113 pages.

- CEMAGREF, 1983. Evaluation de la pollution engendrée par les salmonicultures intensives. Etude n°16, Bordeaux, CEMAGREF, 71 p.
- Charaklis, W.G., Bryer, J.D., Trulear, M.G., Zelver, N., 1980. Biofouling development and its effects on energy losses: A laboratory study, condenser biofouling control. J.F. Garey et al., (Ed.), Ann Arbor Science Publisher.
- Christman, R.F., 1970. Chemical structures of color producing organic substances in water. In : Organic Matter in Natural Water. D.W. Hood (Ed.), *Inst. Mar. Sci.*, Univ. Alaska Publisher, 1: 77-106.
- Corin, N., Backlund, P., Wiklund, T., 1998. Bacterial growth in humic waters exposed to UV-radiation and simulated sunlight. *Chemosphere*, 36 (9) : 1947-1958.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 41 : 435-464.
- Covès, D., Gasset E., 1993. From hatching to fattening. *Aqua. Revue*, 50 : 18-32.
- Coves, D., Gasset, E., 1996. Intensive recirculating production system in sea bass, (*Dicentrarchus labrax* L.). In : Future trends of aquaculture development in Eastern Europe, I. Csavas (Ed.) Handbook of short communication and national reports presented at the international conference on aquaculture development in Eastern Europe, Budapest, Hungary, September 1-5, 1996. EAS et Fish Culture Research Institute, Oostende, 22-23.
- Coves, D., Gasset, E., Lemarié, G., Dutto, G., 1998. A simple way of avoiding wastage in European seabass, *Dicentrarchus labrax*, under self-feeding conditions. *Aquaculture living resources*, 11 : 395-401.
- Creclius, E.A., 1979. Measurements of Oxidants in Ozonized Seawater and Some Biological Reactions. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 39 : 1006-1008.
- Crisp, L.M., Bland, E.B., 1990. Potential use of ozone to disinfect sea water of fungi causing diseases of cultured marine crustacea. *Journal of invertebrate pathology*, 55 : 380-386.
- Cryer, E., 1993. Recent applications of ozone in fresh water fish hatchery systems. In Proceedings of the 3rd International Symposium on the Use of Ozone in Aquatic systems, 8-11 September 1992, Greenwich, Connecticut, W.J. Blogoslawski (Ed.). International Ozone Association, Stamford, USA, 20 p.
- C.T.G.R.E.F. Division Aménagement Littoraux et Aquaculture Groupement de Bordeaux, 1974. L'élevage de l'Anguille en France. *La pisciculture française*, 39 : 34-58.

- Cuesco, M.L., Stickney, R.R., Grant, W.E., 1985. Fish bioenergetics and growth in aquaculture ponds. 1. Individual model development. *Ecological modelling*, 27 : 169-190.
- Devauchelle, N., Covès, D., 1988. Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) reproduction in captivity : Gametogenesis and spawning. *Aquatic living resources.*, 1 (4) : 215-222.
- Dosdat, A., Servais, F., Métailler, R., Huelvan, C., Desbruyères, E., 1996. Comparison of nitrogenous losses in five teleost fish species. *Aquaculture*, 141 : 107-127.
- Doumergue, C., 1996. Etude in vitro de la colonisation de cinq biomatériaux par un biofilm polymicrobien. Thèse de pharmacie. Université Montpellier I. 110 p.
- Ellner, S., 1995. Updated developments in ultraviolet equipment for shellfish depuration. 2. Conf. Internationale sur la purification des Coquillages, Rennes (France), 6-8 Avril 1992. Poggi, R.; Le Gall, J.Y. (Ed.) B : 387-397
- Ellwood, D.C., Hunter, J.R., Longyear, V.M.C., 1974. Growth of *Streptococcus mutans* in a chemostat. *Archives of Oral Biology*, 19 : 659-664.
- Etesse, H., Desnottes, J.F., Dellamonica, P., 1988. L'adhésion bactérienne. *La lettre de l'infectiologie*, 3 : 399-405.
- Fauvel Y., 1962. Utilisation de l'ozone comme agent stérilisateur de l'eau de mer pour l'épuration des coquillages. *Commt. int. Explor. sci. Mer Médit., Rapport et P.V.*, 17 (3) : 701-706.
- Fera, P., Prieur, D., 1986. Etude expérimentale de la colonisation de surfaces par les bactéries, en eau de mer circulantes. In : Deuxième colloque international de bactériologie marine- CNRS, 1-5 octobre 1984 IFREMER, Actes de Colloques 3 : 219-228.
- Forsberg, O.I., 1996. Ammonia excretions rates from post-smolt atlantic salmon, *Salmo salar* L., in land-based farms. *Aquaculture research*, 27 : 937-944.
- Forster, R.P., Goldstein, L., 1969. Formation of excretory products. In : *Fish physiology*. W.S.eR. Hoar, D.J. (Ed). 1 : 313-350.
- From, J., Rasmussen, G., 1984. A growth model, gastric evacuation, and body composition in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, 1836. *Dana*, 3 : 61-139.
- Gagnon, G.A., Ollos, P.J., Huck, P.M., 1997. Modelling BOM utilisation and biofilm growth in distribution systems: review and identification of research needs. *Journal of Water SRT- Aqua* 46 (1) : 165-180.
- Ganderson, L., Chawla, J., Winters, C., Wimpenny, J., Stickler D., 1992. Scanning electron microscopy of bacteria biofilms on indwelling bladder catheters. *European Journal of clinical microb. and infectious diseases*, 11 : 789-796.

- Gerald, E. Speitel, J., DiGiano, F.A., 1987. Biofilm shearing under dynamic conditions. *Journal of Environmental Engineering*, 113 (3) : 464-475.
- Gibbs, M., Schiff, J.A., 1960. Chemosynthesis: The energy relations of chemoautotrophic organisms. In : *Plant Physiology: A treatise*, Vol.IB : photosynthesis and chemosynthesis. Steward, F.C. (Ed.), Academic Press, New-York, USA : 279-319.
- Gillbricht, M., 1980. Gelbstoff vor Nordwestafrika. *Deutsche Hydrographische Zeitschrift*, 33 : 53-67.
- Gjessing, E.T., Källqvist, T., 1991. Algical and chemical effect of U.V. radiation of water containing humic substances. *Water research*, 24 (4) : 491-494.
- Gowen, R.J., Bradbury, N.B., 1987. The ecological impact of salmonid farming in coastal waters: a review. *Oceanography and Marine Biology, Annual Review*, 25 : 563-575.
- Grguric, G., Trefry, J.H., Keaffaber, J.J., 1994. Ozonation products of bromine and chlorine in seawater aquaria. *Water Research*, 28 (5) : 1087-1094.
- Guerin-Ancey, O., 1976. Etude expérimentale de l'excrétion azotée du bar (*Dicentrarchus labrax*) en cours de croissance. I. Effet de la température et du poids du corps sur l'excrétion d'ammoniac en cours de croissance et d'urée. *Aquaculture*, 9 : 71-80.
- Guiraud, J.P., 1998. *Microbiologie alimentaire*. Dunod ,Paris (Ed), 652 pages.
- Hagopian, D.S., Riley, J.G., 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural engineering*, 18 : 223-244.
- Hall, P.O.J., Anderson, L.G., Holby, O., Kollberg, S., Samuelsson, M.O., 1990. Chemical fluxes and mass balances in marine fish cages. I. Carbon. *Marine Ecological Progress Series*, 61 : 61-73.
- Harvey, G., Boran, D. A., Chesal, L.A., Tokar, J.M., 1983. The structure of marine fulvic and humic acids. *Marine Chemistry*, 12 : 119-132.
- Haudidier K., Paquin J.L., Français T., Hartemann P., Grapin G., Colin F., Jourdain M., Block J.C., Cheron J., Pascal O., Levi Y., Miazga J., 1988. Biofilm growth in a drinking water network : a preliminary industrial pilot-plant experiment. *Water Science Technology*, 20 (10/12): 109-115.
- Heinen, J.M., Hankins, J.A., Adler, P.R., 1996. Water quality and waste production in a recirculating trout culture system with feeding of higher energy or lower energy diet. *Aquaculture Research*, 27 : 699-710.
- Heinsbrock, L.T.N., Kamstra, A., 1990. Design and performance of water recirculating systems for eel culture. *Aquacultural engineering*, 9 : 187-207.
- Hepher, B., 1988. *Nutrition of pond fishes*. Cambridge univ. press, Cambridge, UK, 388 p.

- Hirayama, K., Mizuma, H., Mizue, Y., 1988. The accumulation of dissolved organic substances in closed recirculating culture systems. *Aquacultural engineering*, 7 : 73-87.
- Hobbies, J.E., Daley, R.J., Jasper, S., 1977. Use of Nucleopore Filters for Counting Bacteria by Fluorescence Microscopy. *Applied and environmental microbiology*, 33 (5) : 1225-1228.
- Hoigné, J., Bader, H., Haag, W.R., Staehelin, J., 1985. Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water. III. Inorganic compounds and radicals. *Water Research*, 19 : 993-1004.
- Horsley, R.W., 1979. The heterotrophic nitrate-reducing bacterial flora of Grasmere English Lake District. *Journal of applied bacteriology*, 46 : 507-520.
- Hunt, N.K., Marinas, B.J., 1997. Kinetics of *Escherichia coli* inactivation with ozone. *Water research*, 31 (6) : 1355-1362.
- Iriberrí J. Undurraga, A., Muela A., 1985. Heterotrophic bacterial activity in coastal waters : functional relationship of temperature and phytoplankton population. *Ecological modelling*, 28 : 113-120.
- Ishiwatari, R., 1992. Macromolecular material (humic substance) in the water column and sediments. *Marine chemistry*, 39 : 151-166.
- Isoard, P., 1988. Adhésion bactérienne. APEC, APRIA, COBAC. In : Guide de la biocontamination, 174-185.
- Iwai, S., 1983. Technical manual on environmental control and management by microorganism. The society of environmental technology research, Osaka, 264 p.
- Jana, B.B., Roy, S.K., 1985. Spatial and temporal changes of nitrifying bacterial populations in fish ponds of differing management practices. *Journal of Applied Bacteriology*, 59 : 195-204.
- Jolivet E., 1983. Introduction aux modèles mathématiques en biologie. Masson, Paris, 151 p.
- Jorgensen S.E., 1986. Fundamentals of Ecological Modelling. Elsevier, Amsterdam, 389 p.
- Kaiser, E., Herndl, G.J., 1997. Rapid recovery of marine bacterioplankton activity after inhibition by UV radiation in coastal waters. *Applied and environmental Microbiology*, 4026-4031.
- Kalle, K., 1966. The problem of Gelbstoff in the sea. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 4 : 91-104.
- Kaushik, S.J., 1990. Nutrition et alimentation des poissons et contrôle des déchets piscicoles. *La pisciculture française*, 101 : 14-23.

- Keller, A.A., 1989. Modelling the effects of temperature, light, and nutrients on primary productivity : an empirical and mechanical approach compared. *Limnology and Oceanography*, 34 : 82-95.
- Kieber, R.J., Hydro, L.H., Seaton, P.J., 1997. Photooxidation of triglycerides and fatty acids in seawater : Implication toward the formation of marine humic substances. *Limnology and Oceanography*, 42 : 1454-1432.
- Klontz G.N., Brock I.R., Mc Nair, J.R., 1977. Aquaculture technique : water use and discharge quality.- Idaho water Resource Research Institute, Project H. 054- 10 A, 88 p-
- Kogure, K. Simidu, U. Taga N., 1979. A tentative direct microscopic method for living marine bacteria. *Canadian journal of microbiology*, 25 : 415-420.
- Kobayashi, T., Yotsumoto, H., Ozawa, T., Kwahara, H., 1993. Closed circulatory for mariculture using ozone. *Ozone Science & Engineering*, 15 : 311-330.
- Korzeniewski, K. Korzeniewska, J., 1982. Changes in the composition and physiological properties of the bacterial flora of water and bottom sediments in Lake Letowo, caused by intensive trout culture. *Polish archiv hydrobiology*, 29 : 671-682.
- Lawrence, J.R., Snyder, R.A., 1998. Feeding behaviour and grazing impacts of a Eurotes sp. on attaches bacteria. *Canadian journal of microbiology*, 44 (7) : 623-629.
- Laurent, P., 1984. Gill internal morphology. In :Fish physiology : Gills, Academic Press, London. 10a : 173-184.
- Lemarié, G., Dutto, G., Le Roux, A., Lemoalle, J., Maxime V., Person-Le-Ruyet, J., 2000. Long term effects of pH and carbon dioxide on growth and feed efficiency in european seabass. In : Responsible aquaculture in the new millenium. 2000 , Nice, France, Mai 2-6, 2000. EAS special publication n°28. Oostende, Belgium, European aquaculture society, p. 384.
- Lemarié, G., Martin, J.M., Dutto, G., Garidou, C., 1998. Nitrogenous and phosphorus waste production in flow-through land-based farm of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture living resources*, 11 : 247-254.
- Lemarié, G., Gasset, E., Cam, E., de la Fonchais, E., 1992. Modélisation de la consommation en oxygène du Loup (*Dicentrarchus labrax*) et de la Daurade (*Sparus auratus* L.). *Ichthyophysiological Acta.*, 15 : 55-68.
- Lesel, R., 1979. Etude de la nitrification dans les circuits d'eau recyclée. II. Dynamique des microflores bactériennes. *Bulletin du Centre d'études et de recherches scientifiques, Biarritz*, 12 (4) : 651-680.

- Lesel, R., Leffemberg, F., 1977. Etude de la nitrification dans les circuits d'eau recyclée. I. Oxydation des nitrites. Bulletin du Centre d'études et de recherches scientifiques, Biarritz, 11 (4) : 441-459.
- Liltved H., Hektoen, H., Efraimsen, H., 1995. Inactivation of bacteria and viral fish pathogens by ozonation or UV Irradiation in water of different salinity. Aquacultural engineering, 14 : 107-122.
- Lund, V., Hondve, D., 1994. Ultraviolet irradiated water containing humic substances inhibits bacterial metabolism. Water Research, 28 (5) : 1111-1116.
- Mac Coy W.F., Bryers J.D., Robbins J., Costerton J.W., 1981. Observation of fouling biofilm formation. Canadian journal of microbiology, 27 : 910-917.
- Maita Y., Yanada M., 1978. Particulate protein in coast waters, with special reference to seasonal variation. Marine biology, 44 : 329-336.
- Mallat, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants : a statistical review. Canadian journal of fisheries and aquatic sciences, 42 : 630-648.
- Mathieu, L., Paquin, J.L., Block, J.C., Random, G., Maillard, J., Reasoner, D., 1992. Parameters governing bacterial growth in water distribution systems. Revues des sciences de l'eau, 5 : 91-112.
- Marshall K.C., 1985. Mechanisms of bacterial adhesion at fluid water interfaces. In : Bacterial Adhesion Ed Plenum Press, NY and London. 133-157.
- Mesplé, F., 1993. Modélisation des processus biologiques et physico-chimiques dans un écosystème aquatique eutrophe : le lagunage à haut rendement. Thèse de doctorat. Université de Montpellier I, 300 p.
- Mesplé, F., Casellas, C., Trousselier, M., Bontoux, J., 1996. Modelling orthophosphate evolution in high rate algal pond. Ecological Modelling, 89 : 13-21.
- Meyer A., Deiana J., Leclerc H., 1984. Cours de microbiologie générale. Doin, Paris, 333 p.
- Miller, W.L., Moran, M.A., 1997. Interaction of photochemical and microbial processes in the degradation of refractory dissolved organic matter from coastal marine environment. Limnology and oceanography, 42 (6) : 1317-1324.
- Misra, V., Pandey, S.D., Viswanathan, P.N., 1996. Environmental significance of humic acid in the sequestration of metals. Chemistry and Ecology, 13 : 103-112.
- Moran, M.A., Hodson, R.E., 1994. Support of bacterioplankton production by dissolved humic substances from three marine environments. Marine ecology progress series, 110 : 241-247.
- Muir, J.F., 1982. Recirculating water systems in aquaculture. In : Recent Advances, J.F. Muir and R.J. Roberts (ed) London, Blackwell scientific publications, 357-449.

- Muller-Feuga, A., 1990. Modélisation de la croissance des poissons en élevage. Rapport Sciences et Techniques. Ifremer, 21 : 58 p.
- Nebel, C., 1981. Ozone treatment for cooling towers. In :Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. London, Interscience Publisher. 16 : 683-713.
- Ogura, N., 1977. High molecular weight matter in seawater. Marine Chemistry, 5 : 535-49.
- Otte, G., Hilge, V., Rosenthal, H., 1977. Effect of ozone on yellow substances accumulated in a recycling system for fish culture. International Council for the exploitation of the sea. Fisheries Improvement Committee, C.M.-E, 27 p.
- Ozawa, T., Yotsumoto, H., Sasaki, T., Nakayama, S., 1991. Ozonation of seawater- Applicability of ozone for recycled hatchery cultivation. Proceeding 10th Ozone World Congress IAO : 471-4821.
- Paat, S., Sugita, H., Sidik, A.S., Sugimoto, Y. Deguchi, Y., 1989. The water quality and microflora of a carp rearing tank with a recirculating water system. Lab. Aquaculture, Coll. Agr.&Vet.Med., Nihon Univ., 46 : 28-33.
- Pagand, P., 1999. Traitement des effluents piscicoles marins par lagunage à haut rendement algal. Thèse de doctorat, Université de Montpellier I. 218 p.
- Pagand, P., Blancheton, J.P., Casellas, C. 2000. A model for predicting the quantities of dissolved inorganic nitrogen released in effluents from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) recirculating water system. Aquacultural engineering, 22 : 137-153.
- Pearson-Le-Ruyet, J., Bœuf, G., 1998. L'azote ammoniacal, un toxique potentiel en élevage de poissons: le cas du Turbot. Bulletin français de la pêche et de la pisciculture, 350-351 : 393-412.
- Pedersen K., 1982. Factors regulating microbial biofilm development in a system with slowly flowing seawater. Applied and environmental microbiology, 1196-1204.
- Peele, E.R. Colwell R.R., 1981. Application of a direct microscopic method of enumeration of substrate-responsive marine bacteria. Canadian journal of microbiology, 27 : 1071-1075.
- Percival, S.L., Knapp, R.J.S., Edyvean, R., Wales, D.S., 1998. Biofilm development on stainless steel in mains water. Water research, 32 (1) : 243-253.
- Personné, J.C. Doumergue, C. Jeannot, J.L. Dusart, G., 1995. Etude comparative de la capacité de de biomatériaux à supporter la formation de biofilms. In : Adhesion des micro-organismes aux surfaces. Lavoisier Tech & Doc, London- Paris- New-York, 194-207.
- Petit, J., Ferron, J.-L., 1975. Les problèmes de l'eau en pisciculture. Première partie.- Le recyclage. La pisciculture française, 42 : 18-23.

- Pillay, B., Roth, G., Oellermann, R.A., 1989. Nitrification and the enumeration of marine nitrifying bacteria in a closed prawn-culture system. *South African journal of marine sciences*, 8 : 325-332.
- Pogorny, J., 1981. Browning from lipid-protein interactions. *Program of Food Nutrition Science*, 5 : 512-428.
- Ramos, N.C., Ring, J.F., 1980. The practical use of ozone in large marine aquaria. *Science and Engineering*, 2, 225-258.
- Randall, D.J., Wright, P.A., 1987. Ammonia distribution and excretion in fish. *Fish physiology and Biochemistry*, 3: 107-120.
- Randi, A.S., Montserrat, J.M., Rodriguez, E.M., Romano, L.A., 1996. Histopathological effects of cadmium on the gills of the freshwater fish, *Macropsobrycon uruguayanae* Eigenmann (Pisces, Atherinidae). *Journal of Fish Diseases*, 19 : 311- 322.
- Rashid M.A., Vilks G., 1977. Environmental controls of methane production in Holocene basins in Eastern Canada. *Organic chemistry*, 1 : 53-59.
- Richardson, L.B., Burton, D.T., Helz, G.R., Rhoderick, J.C., 1981. Residual oxidant decay and bromate formation in chlorinated and ozonated sea-water. *Water research*, 15 : 1067-1074.
- Reay, D., David, Nedwell, B., Priddle, J., Cynan Ellis-Evans, J., 1999. Temperature dependence of inorganic nitrogen uptake : reduced affinity for nitrate at suboptimal temperatures in both Algae and Bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 2577-2584.
- Reid, B., Arnold, C.R., 1994. Use of ozone for water treatment in recirculating-water raceway systems. *The progressive fish-culturist*, 56 : 47-50.
- Reynolds, E., (1963). The use of lead citrate at high pH as an electropaque stain in electron microscopy. *Journal of cell biology*, 17 : 208-212.
- Rheinheimer, G., 1980. *Aquatic Microbiology*. John Wiley&Sons, Deuxième édition, New-York.
- Rodier, J., 1984. *L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduelles, eau de Mer*. Septième édition, Dunod (Ed), Paris, FR, 1365 p.
- Roques H., 1980. *Les fondements théoriques du traitement biologiques des eaux*. Vol II. Ed. Lavoisier, Tech&Doc. 1813 p..
- Rosenlund, B.D., 1975. Disinfection of hatchery influent by ozonisation and effects of ozonated water on rainbow trout. *International Ozone Institute* : 59-69.
- Rosenthal, H., Kruner, G., Otte, G., 1978. Effects of ozone treatment on recirculating water in a closed fish culture system. *ICES, CM F-12* : 1-15.

- Rueter, J., Johnson, R., 1995. The use of ozone to improve solids removal during disinfection. *Aquacultural engineering*, 14 : 123-141.
- Rutter, P., Leech, R., 1980. The deposition of *Streptococcus sanguis* NCTC 7868 from a Flowing Suspension. *Journal of general microbiology*, 120 : 301-307.
- Ryttmann, B.E., 1982. The effect of shear stress on biofilm loss rate. *Biotechnology and bioengineering*, 24 : 501-506.
- Schuster C., 1994. The effect of fish meal content in trout food on water colour in a closed recirculating system. *Aquaculture international*, 2 : 266-269.
- Servais, P., Billen G., Hascoët, M.C., 1987. Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Water research*, 21 (4) : 445-450.
- Servais, P., Billen, G., Martinez, J., Vives-Rego, J., 1989. Estimating bacterial mortality by the disappearance of ³H-labeled intracellular DNA. *FEMS microbiology ecology*, 62 : 119-126.
- Servais, P., Billen, G., Vives-Rego, J., 1985. Rate of bacterial mortality in aquatic Environments. *Applied and environmental microbiology* 49 (6): 1448-1454.
- Sherr, B.F., Sherr, E.B., Andrew, T.L., Fallon, R.D., Newell, S.Y., 1986. Trophic interactions between protozoa and bacterioplankton in estuarine water analysed with selective metabolic inhibitors. *Marine ecology progress series*, 22 : 169-179.
- Sibille, I., Sime-Ngando, T., Mathieu, L., Block, J.C., Hartemann, P., 1998. Protozoaires bactérivores et stabilité biologique dans les réseaux de distribution d'eau potable. Groupement des Protistologues de Langue Française, XXXVIème réunion annuelle, Tunis, 21-25 mai 1998.
- Sich, H., Van Rijn, J., 1992. Distribution of bacteria in a biofilter-equipped semi intensive fish culture unit. Special Publication European Aquaculture Society, Oostend, European aquaculture society, 17 : 55-78.
- Sieburth, J.McN., Jensen, A., 1969. Studies on algal substances in the sea. Formation of Gelbstoff (Humic Acid) by exudates of phaeophyta. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 3 : 275-289.
- Singh, A., Fei-Peng Y., McFeters G.A., 1990. Rapid detection of Chlorine-Induced Bacterial Injury by the Direct Viable Count Method Using Image Analysis. *Applied environmental microbiology*, 56 (2) : 389-394.
- Skidmore, J.F., 1964. Toxicity of zinc compounds to aquatic animals, with special reference to fish. *Quarterly review of biology*, 39 : 227-248.
- Skidmore, J.F.,Tovell, P.W.A., 1972. Toxic effect of zinc sulphate on the gills of rainbow trout. *Water Research*, 6 : 217-230.

- Speare, D.J., Arsenault, G., MacNair, N., Pwell, D., 1997. Branchial lesions associated with intermittent formalin bath treatment, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 20 : 27-33.
- Skopintsev B.A., 1959. Organic matter in sea water. *Prepr. Int. Oceanog. Congr.*: 953-954.
- Solerzo, L., Charp, J.H., 1980. Determination of total dissolved nitrogen in natural waters. *Limnology and oceanography*, 25 : 771-754.
- Sohier, L., Bianchi, M., 1986. Evolution de la communauté bactérienne hétérotrophe de l'eau de mer lors d'une expérience d'aquaculture de crevettes péneïdes en systèmes clos. **Deuxième colloque international de bactériologie marine, Brest, 1-5 octobre, 1984.** IFREMER, CNRS, Brest. acte de colloques, 3 : 283-292.
- Stewart, W.D.P., Sinada F., Christofi, N., Dafi, M.J., 1977. Primary production and microbial activity in Scottish freshwater habitats. In : *Aquatic Microbiology*. Skinner, F.A. & Sheman, J.M. (Ed), Academic Press, London, 369 pages.
- Storebakken, T., Austreng, E., 1987. Ration levels of salmoniids. II. Growth, feed intake, protein digestibility, body composition, and feed conversion in rainbow trout weighing 0.5-1.0 kg. *Aquaculture*, 60 : 207-221.
- Sugita, H., Takayama, M., Ohkoshi, T., Deguchi Y., 1992. Occurrence of microaerophilic bacteria in the water and sediment of a grass carp culture pond. *Aquaculture*, 103 : 135-140.
- Sverdrup, H.U., Johnson, M.W., Fleminget, R.H., 1963. *The oceans : their physics, chemistry, and general biology*. N.J. Prentice-hall, Englewood Cliffs, N.J., USA. 1087 p.
- Takeda, S., Kiyono M., 1990. The characterisation of yellow substances accumulated in a closed recirculating system for fish culture. **Biology Department, Central Research Institute of Electronic Power Industry, Chiba, Japan** :. 129-132.
- Tanguy, R., Le Grel, L., 1989. **Projet d'élevage du loup de mer: étude technico-économique du pré-grossissement et de grossissement. Rapports internes de la direction des ressources vivantes. DRV-89.021-RA/SDA Palavas, IFREMER, 91 p.**
- Thelu, P., 1987. Toxicité de l'eau de mer chlorée pour les poissons marins. Thèse de Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Maison Alfort, 80 p.
- Thorpe, J.E., Talbot, C., Miles, M.S., Rawling, C., Keay, D.S., 1990. Food consumption in 24 hours by atlantic salmon (*Salmon salar* L.) in sea cage. *Aquaculture* 90 : 41-47.
- Torri, G., Torri, J., 1985. Caractérisation de substances humiques isolées à partir d'eaux de mer issues de la lagune de Brus. *Vie marine*, 7 : 69-73.

- Traunspurger, W., Bergtold, M., Goedkoop, W., 1997. The effect of Nematodes on bacteria activity and abundance in a freshwater sediment. *Oecologia*, 112 (1): 118-122.
- Van der Kooij, D., Visser, A., Hijnen, W.A.M., 1982. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *Journal of American Water Works Association* : 540-545.
- Van der Meer, M.B., Faber, R., Zamora, J.E., Verdegem, J.C.M., (1997). Effect of feeding level on feed losses and feed utilization of soya and fish meal diets in *Colossoma macroponum* (Cuvier). *Aquaculture research*, 28 : 391-403.
- Wickins J.F., 1985. Organic and inorganic carbon levels in recycled seawater during the culture of tropical prawns *Penaeus sp.*. *Aquacultural engineering*, 4 : 59-84.
- Warner-Hansen, I., 1982. Methods of treatment of waste water from trout farming. EIFAC Technical paper, 41 : 113-121.
- Wu, R.S.S., 1995. The environmental impact of marine fish culture: toward a sustainable future. *Marine pollution bulletin*, 31 : 4-12.
- Yang, M., Uesugi K., Myoga, H., 1999. Ammonia removal in bubble column by ozonation in the presence of bromide. *Water research*, 33 (8) : 1911-1917.
- Zimmermann, R., Iturriaga, R., Becker-Birck, J., 1978. Simultaneous Determination of Total Number of Aquatic Bacteria and The Number Thereof Involved in Respiration. *Applied and environmental microbiology*, 36 (6) : 926-935.

PUBLICATIONS

LEONARD N., BLANCHETON J.P., GUIRAUD J.P., 2000. Populations of heterotrophic bacteria in an experimental recirculating aquaculture system. *Aquacultural Engineering*, 22; 109-120.

LEONARD N., E. GASSET, J.P. CAILLERES, J.P. GUIRAUD, J.P. BLANCHETON. Bacteria and nutrients -nitrogen and carbon- in a recirculation system for sea bass production. *Aquacultural Engineering*. Soumise.

PRÉSENTATIONS ORALES

LEONARD N., GASSET E., CAILLERES J.P., GUIRAUD J.P., BLANCHETON J.P., 1999. Bacteria and humic substances in a recirculating system for sea bass production. In: *Towards predictable quality*, Aquaculture Europe '99 (Trondheim, Norway). L. Lindsay and H. Reinertsen (eds.), European Aquaculture Society, Special publication n° 27, Oostende, Belgium, june 1999, p. 148.

LEONARD N., BLANCHETON J.P., GUIRAUD J.P., 2000. Modelling of the heterotrophic bacteria population in a recirculating fish rearing system. In : *International conference and exhibition, responsible aquaculture in the new millennium*. Aqua 2000 (Nice, France). R. Flos and L. Ceswell (eds.), European Aquaculture Society, Special communication n°28, Oostende, Belgium, March 2000, p.388.

POSTERS

LEONARD N., BLANCHETON J.P., J.P. GUIRAUD J.P., 1998. Populations of heterotrophic bacteria in a recirculating fish rearing system. In : *Aquaculture and water, fish culture, shellfish culture and water usage*, Aquaculture Europe '98 (Bordeaux, France). H. Grizel and P. Kestemont (eds.), European Aquaculture Society, Special publication n° 26, Oostende, Belgium, August 1998, p. 169.

LEONARD N., BLANCHETON J.P., GUIRAUD J.P., FAUVEL C., TAKEDA S, 1998. Yellow substances in fish recirculating system. In : *Aquaculture and water, fish culture, shellfish culture and water usage*, Aquaculture Europe '98 (Bordeaux, France). H. Grizel and P. Kestemont (eds.), European Aquaculture Society, Special publication n° 26, Oostende, Belgium, August 1998, p. 171.

ANNEXE N°2.1.
COMPOSITION DE L'ALIMENT.

La composition est celle donnée par le fournisseur.

Tableau n°1. Analyse moyenne de l'aliment.

Ecolife 17.20 Bar	Composition	Digestibilité	Distribution énergétique
Energie brute	22,2 MJ 5290 kcal	89%	
Energie digestible	19,4 MJ 4640 kcal		
Matières protéiques brutes	45,00%	90%	50%
Matières grasses brutes	21,50%	90%	40%
ENA	15,50%	82%	10%
Cellulose brute	2,0%	Vitamines au kg d'aliment A : 20000 UI D ₃ : 2500 UI E : 200 mg	
Cendres brutes	9,0%		
P Total	1,2%		
P disponible	1,1%		
Méthionine + cystéine	1,7%		

Tableau n°2. Valeur Ecologique (kg rejeté par tonne de production).

I.C. = 1,30 (25,6 MJ)			I.C. = 1,50 (29,6 MJ)		
	Azote	Phosphore		Azote	Phosphore
Dissous dans l'eau :	51,8 kg	3,4 kg	Dissous dans l'eau :		4,4 kg
Décantable :	13,0 kg	5,2 kg	Décantable :	15,8 kg	6,6 kg

ANNEXE N°2.2.

COURBE D'ETALONNAGE DE LA COLONNE D'EXCLUSION

La droite d'étalonnage correspondante est la suivante : $\log(MM) = -0,0042 \times V_e + 3,5$.

Le coefficient de corrélation R^2 est égal à 0,9987. V_e est le volume d'éluion et MM la masse molaire de la molécule étudiée.

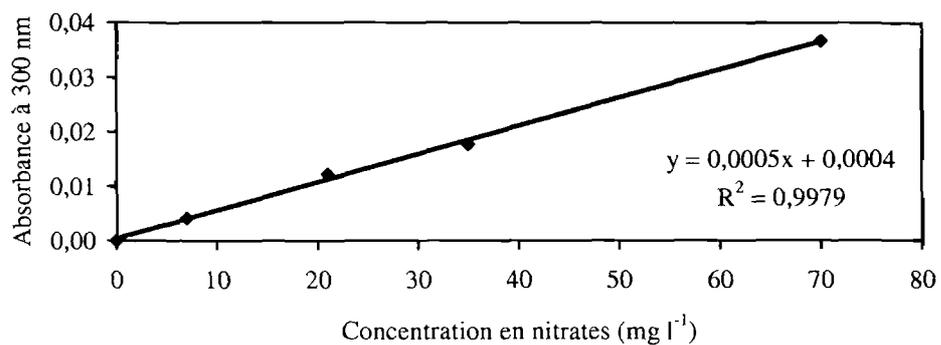
Tableau. Caractéristiques de la courbe d'étalonnage obtenue sur la colonne d'exclusion.

Etalons	Volume (ml)	log MM
Albumine	60	3,25
Vitamine B12	87	3,13
Nystatine	129	2,97
Acide Fusidique	183	2,73

ANNEXE N°2.3.

ABSORBANCE DES NITRATES A 300 NM

La courbe ci dessous présente les absorbances à 300 nm de solutions de concentration croissante en nitrates (relation linéaire).



ANNEXE 3.1. :

BACTERIA AND NUTRIENTS -NITROGEN AND CARBON- IN A RECIRCULATING SYSTEM FOR SEA BASS PRODUCTION

N. LEONARD¹, J.P. GUIRAUD¹, E. GASSET², J.P. CAILLERES³ and J.P. BLANCHETON².

¹USTL. Laboratoire GBSA - Place E. Bataillon 34000 Montpellier France.

²IFREMER. Chemin de Maguelone 34250 Palavas-Les-Flots, France.

³Wedeco Katadyn France BP 39 44680 Roissy-en-Brie France.

Corresponding author: J.P. BLANCHETON².

Abstract

In recirculating rearing system, different chemical matter (nitrate, phosphorus and dissolved organic carbon) are accumulated depending on the quantity of replacement water added in the system. Part of them can be used as bacterial nutrients. The aims of the present study were (1) to focus on the different forms of dissolved carbon ; (2) to establish if there was a relation between the dissolved forms of the nutrients (N and C) and bacterial concentrations. We observed that the nature of DOC changed as the volume of replacement water was decreased, and that HS were accumulated. The concentration of fixed and free bacteria was constant at $3.13 \times 10^5 \pm 2.6 \times 10^5$ CFU \times g⁻¹ of packing and $3.29 \times 10^3 \pm 2.09 \times 10^3$ CFU \times ml⁻¹ (M \pm SD) respectively whatever the quantity of replacement water added in the system. This shows that the quantity of dissolved available carbon was not the limiting factor for heterotrophic bacterial growth. The quantity of replacement water was not the most important factor to control heterotrophic bacteria population. What appears to be vital is the quantity of feces reaching the biological filter, which can be reduced by a good mechanical filtration and a good fish feed conversion index.

Keywords

Heterotrophic bacteria, carbon, humic substance, nitrogen, recirculating aquaculture systems.

The dynamics of growth in every living population are closely linked to the quantity of available nutrients. Bacteria assimilate nutrients in dissolved form, either directly or after extra cellular hydrolysis of particulate matter. In aquatic systems the most frequent limiting factor for heterotrophic bacteria is carbon, whereas nitrogen and phosphate are seldom limiting.

In fish farming systems, heterotrophic bacteria constitute a very important factor in terms of the diseases they may cause in fish, the metabolic by-products and the substances they release after cellular lysis, their consumption of oxygen and the competition that may occur with autotrophic bacteria. Nevertheless, the few studies that have been carried out on this kind of bacteria concerned only their pathogenic effect on autotrophic nitrifying bacteria. In relation to the carbon cycle, some authors have described the accumulation of the humic substances that are responsible for the yellow-brownish coloration of the water in fish farms (Hirayama 1988 and Takeda 1990). These substances may have a deleterious effect on fish growth (Hirayama 1988). Concerning the nitrogen and phosphorus cycles, several investigators have studied such systems and found that nitrate and phosphate are accumulated (Hirayama, 1974, Pagand, 2000, Tiews, 1981). Teleost species such as *Dicentrarchus labrax* excrete nitrogen mainly in the form of ammonia, which is released through the gills and in urea (Handy and Poxton 1993). In a recirculating system, the nitrifying (biological) filter transforms the excreted ammonia and urea into nitrates. Thus, nitrogen is accumulated as nitrates and this may be used as an end-point index of the system.

The aim of our research is to understand the dynamics of the parameters which influence the growth of heterotrophic bacteria in a fish farm. In a previous study we showed that : (1) the biological filter is the main source of free bacteria, which are released into the system when the fixed bacteria are sheared from the filter ; (2) as a direct result of this, the number of free bacteria in the system depends on the number of fixed bacteria in the biological filter ; (3) equally, the number of heterotrophic bacteria in the system increased when the quantity of replacement water was decreased, resulting in an increase in the total amount of dissolved organic matter in the system (Leonard, 2000). This first series of experiments led us to further investigate the correlation between the concentration of nutrients, and especially the different forms of dissolved organic carbon, and the number of bacteria (circulating and fixed). The aims of the present study were (1) to examine the different forms of dissolved carbon ; (2) to establish if there was a relation between the dissolved forms of the nutrients (N and C) and bacterial concentrations. Thus, for different volumes of replacement water added to the experimental fish farm (with *Dicentrarchus labrax*), the concentrations of the different forms

of dissolved inorganic nitrogen (DIN), dissolved organic C and the number of heterotrophic bacteria were evaluated.

MATERIALS AND METHODS

THE EXPERIMENTAL FISH FARM

A general diagram of the recirculating water system and the sampling site used in this study are shown in Fig.1. The operational characteristics of the system are described in the Table 1. Two experimental pilot-scale recirculating systems with a total water volume of 6 m³ were studied over ten months. The biomass of the fish (*Dicentrarchus labrax*) was maintained below 10 kg×m⁻³ in the tanks to avoid back washes of the biological filter and the use of an external supply of O₂. An ultraviolet (UV) disinfection unit (20W) at the inlet of the biological filter was used to reduce the number of free bacteria. The replacement water volume was adjusted in order to maintain a stabilized ratio (R-ratio), calculated as the daily weight of ingested feed (kg) per daily replacement water volume (m³). This R-ratio, which characterized the recirculation level, was varied between 0.06 and 3.5 kg×m⁻³.

WATER SAMPLING

Water samples were taken every week directly at the inlet and the outlet of the biological filter to measure the number of free bacteria. For fixed bacteria, a sample of packing was taken at the top of the biological filter. The sampling valves of the system were disinfected and rinsed before each sampling.

MICROBIOLOGICAL ANALYSIS

Revivification and ultrasonic treatment

A 45-min revivification was performed in yeast extract medium (0.3g×l⁻¹) NaCl (34g×l⁻¹) (Kogure et al., 1979, Peele and Colwell, 1981, Singh 1990). The pH was adjusted to 7.6. In order to remove the biofilm from the filter media and to separate the bacteria aggregates, the sample was given a 10-min ultrasonic treatment (20kHz, 50W) at the beginning of the revivification. For free bacteria, 10 ml of the sample were mixed with 90 ml of the revivification medium ; the solid sample were mixed with 200 ml of revivification media.

Enumeration media

Counts of viable heterotrophic bacteria (CFU) were made in Marine Agar (Difco 2216) after 10 days of culture at 25°C. Dilutions were prepared in $34\text{g}\times\text{l}^{-1}$ sterile sodium chloride solution. Plates were set up in duplicate for each dilution.

CHEMICAL ANALYSIS

Ammonia, nitrites and nitrates were analyzed with a Technicon® Autoanalyzer II, as described in Treguer and Le Corre (1974). DOC was analyzed with a Shimadzu TOC 500 analyzer (mineralization in a furnace at 680°C, after acidification to $\text{pH}<2$ and bubbling for 15 minutes with CO_2 free air). HS were analyzed by measuring their absorption at 300 nm with a blank containing the same nitrate concentration as the sample, as nitrates absorb at 300 nm (Hirayama et al., 1988). The relation between HS carbon content and absorption at 300 nm was studied using HS extracts that were obtained by extraction on a Bio-rad sephadex Iron III form column, as described by Almgren (1975) and Takeda (1990). HS were dried using a rotary evaporator and lyophilized. A relationship was established between DOC and the absorbency at 300nm of a HS solution reconstituted in distilled water. The molecular weight distribution of the HS was evaluated by gel filtration chromatography on a P2 bio-gel (Bio-rad) eluted with a phosphate buffer ($\text{pH}=8$) (Takeda et al., 1990). The calibration curve of the exclusion column was obtained with four standards ($r^2 = 0.9987$): albumin serum (exclusion weight of $1800\text{ g}\times\text{mol}^{-1}$), vitamin B 12 ($1355\text{ g}\times\text{mol}^{-1}$), nystatin ($941\text{ g}\times\text{mol}^{-1}$) and fusidic acid ($538\text{ g}\times\text{mol}^{-1}$). For each sample, the relation between HS and DOC was obtained by subtracting the DOC, which corresponds to the quantity of carbon derived from the HS.

The carbon, nitrogen, hydrogen, oxygen and sulfur contents were determined on the freeze-dried humic substances. Carbon and oxygen contents were determined after combustion at 1050°C by measurement of CO_2 and H_2O using infrared spectrometry. Nitrogen content was determined after combustion at 1050°C and reduction of the nitrogen oxides by catharometry (*thermal conductivity*) measurement of N_2 . Sulfur content was determined after combustion at 1320°C by coulometric measurement of sulfur dioxide. Oxygen was determined after pyrolysis at 1080°C ; the oxygen was transformed into CO by passing it through active carbon at 1120°C and CO was measured by infrared spectrometry.

GROWTH RATE AND DOC TO BACTERIA CONVERSION YIELD

The bacteria conversion yield ($Y_{x/s}$) is the relationship between the amount of bacterial biomass formed and DOC utilization during bacterial growth. The growth rate and $Y_{x/s}$ were

measured by bioassays using the method of Servais (1985) : (1) the sample (300 ml) is first filtered (Sartorius cellulose nitrate, 0.22 μm) under sterile conditions; (2) 30ml of the sample is then re-inoculated together with a natural assemblage of bacteria from the same origin as the sample and which was first filtered through a GF/C (1.2 μm) membrane in order to eliminate large particles and protozoans ; and finally (3) the samples were incubated for 8 days at 25°C. The DOC and the concentration of bacteria were measured twice a day during the first few days, then once a day. This assay was performed at two different concentrations of DOC: 8 and 4 $\text{mg}\times\text{l}^{-1}$ of carbon.

STATISTICS

After analysis of variance (ANOVA), all the data were analyzed by linear regression analysis with the R-ratio as the treatment. For the DOC concentrations versus the R-ratio, the data were ln-transformed and the regression between ln(DOC) and R was established.

RESULTS

CHARACTERIZATION OF THE HUMIC SUBSTANCES (HS)

Table 2 shows the spectrophotometric properties of the isolated HS. The gel-filtration chromatogram (Fig. 2) shows that the extract contained 2 or 3 kinds of molecules with molecular weights distributed around 1220 $\text{g}\times\text{mol}^{-1}$.

The elementary composition of HS were 55.1% C, 8.4% H, 18.3% N, 18.1% O and no S. This corresponds to atomic ratios of 1.8 H/C, 0.28 N/C and 0.25 O/C.

CHARACTERIZATION OF THE WATER IN THE SYSTEM VERSUS R-RATIO

Figure 3 shows a linear correlation between the R-ratio and the absorbency at 300nm due to the HS.

$$\text{HS} = 0.026 \times \text{R} + 0.016 \quad (r^2 = 0.93)$$

The study of the HS solution shows that one absorbency unit at 300nm corresponds to 124 $\text{mg}\times\text{l}^{-1}$ of DOC. Figure 4 shows a logarithmic correlation between the R-ratio and the DOC concentrations:

$$\text{DOC} = 2.62 \times \ln(\text{R}) + 9.69 \quad (r^2 = 0.75)$$

The study of the HS solution reconstituted in distilled water shows that a HS solution of 1 absorbency unit (at 300 nm) contains $124.5 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ of DOC. This allows us to calculate the amount of HS carbon in the total quantity of DOC versus the R-ratio (Fig. 5). There was a linear correlation between these two parameters.

$$\text{HS/COD} = 0.103 \times R + 0.50 \quad (r^2 = 0.65)$$

Fig. 6 shows a linear correlation between the R-ratio and the DIN concentrations.

$$\text{DIN} = 40.6 \times R + 6.99 \quad (r^2 = 0.97)$$

The slope of the curve represents the quantity (in grams) of DIN released in the system: $40.6 \pm 2.8 \text{ g}$ of DIN per kg of ingested feed. The concentrations of ammonia and nitrites were respectively 0.04 and $0.4 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$, which represented less than 1% of the DIN.

Good correlations were found between the R-ratio and each chemical parameters measured; table N°3 presents the statistical analysis.

RELATION BETWEEN R AND BACTERIAL POPULATIONS

Fig. 7 shows the concentration of fixed bacteria in the biological filter and of free bacteria released from the outlet of the biological filter. The concentration of bacteria was stable in the system at $3.13 \times 10^5 \pm 2.6 \times 10^5 \text{ CFU} \times \text{g}^{-1}$ of packing and $3.29 \times 10^3 \pm 2.09 \times 10^3 \text{ CFU} \times \text{ml}^{-1}$ ($M \pm SD$) respectively. The concentration of bacteria entering the biological filter was less than $10^2 \text{ CFU} \times \text{ml}^{-1}$. Given the retention time in the biological filter (0.03h) and the concentration of bacteria at the inlet of the biological filter, the growth of bacteria entering the biological filter was negligible.

GROWTH RATE AND $Y_{x/s}$

Concerning the variations of DOC and the concentration of bacteria during the incubation of the sample, a rapid decrease of DOC was observed during the first 75h, followed by a period of stabilization. Concurrently the number of bacteria increased during the first 75h, then diminished as the bacteria died. After 200h, the DOC increased again as a result of carbon discharge when the dead bacteria lysed (Servais et., 1985). $Y_{x/s}$, defined as the ratio between bacterial biomass produced and organic matter utilized, was calculated to be $3 \times 10^8 \text{ UFC} \times \text{mg}^{-1} \text{ C}$. The growth rates calculated from the growth of the assemblage bacteria were 0.097 and 0.142 h^{-1} .

DISCUSSION

Nutrient concentrations.

There was a linear correlation between the concentration of nitrates and the R-ratio, corresponding to a constant rate of 40.6g N-NO₃ per kg of ingested food or 73% of ingested nitrogen. In a recirculating system, Pagand et al. (2000) observed a decrease from 65% to 35% of nitrogen released when the replacement water volume was lowered from 200 to 25% of replacement water per day. Heinen (1996), using a recirculating system with rainbow trout, found the same kind of results. Lemarié et al. (1998) observed a discharge of 80% in a flow-through system, with ammonia as the main form of nitrogen (divided into 65-70% for dissolved waste and 5-10% for solid waste). There are two hypotheses which could explain the decreases described by both Pagand and Heinen : (1) a possible denitrification in some anoxic areas of the biological filter (80%-73% =7 %); or (2) the fixation of nitrogen by bacteria or particulate matter, which are eliminated by backwashes (73%- [65 to 35%] =8 to 38%). The improved recovery of the organic matter balance sheet (80% and 73% respectively) of dissolved nitrogen, found by Lemarié (1998) and by us in rearing systems without loss of nitrogen in backwashes, confirmed the second hypothesis.

The concentration of DOC correlated with the R-ratio. The logarithmic relation between these two factors shows that the quantity of DOC accumulated per kg of feed decreased as the R-ratio increased. Hirayama (1988) found 16 mg×l⁻¹ of DOC in the water of an aquarium at an R-ratio of 2 kg×m⁻³, whereas the concentration of DOC was 11 mg×l⁻¹ in our system. This difference is probably due to the management of the mechanical filtration: in our system, feces were removed every day, while in the aquarium the biological filter was used as a mechanical filter and was not washed during their experiments.

The humic substances are fluorescent hydrophobic dissolved organic matter (Amador et al., 1990). They are produced by the auto-oxidation of polyunsaturated fatty acids released into the water column by plankton (Harvey et al., 1983). In our system they probably result from the discharge of fish feces, uneaten feed, and the lysis of dead bacteria. A comparison of the quantities of HS found in the literature is difficult because of the diversity of the methods used (Table 4). This table shows that HS are often measured by UV absorbency or by fluorescence, which are both relative measurements. Fluorescence activity is measured with an excitation wavelength of between 350 and 360 nm and an emission wavelength between 430 and 490 nm. The maximum fluorescence wavelengths found in our experiment (370 nm and 470 nm) were in line with those published in the literature. The molecular weight of around 1200 g×mol⁻¹ corresponds to the formula proposed by Harvey (1983). The HS isolated in our system are comparable to the HS described in the literature for seawater (Table 4) and for fish farm seawater (Hirayama, 1988 and Takeda, 1990). The comparison of our results

with the values reported by Ishiwatari (1992) shows that the percentage of carbon (55.1%) is in the range of all the HS isolated (51.9 to 57.94%) but the H/C and N/C ratios are higher than the other, which shows that the quantity of nitrogen in our humic substances is high.

The amount of HS in the total DOC depends on the R-ratio, which indicates that the composition of the DOC changed when the quantity of replacement water diminished. The accumulation of HS proved that they are not used as a source of carbon by the bacteria, in agreement with the findings of Ogura (1977) and Corin et al., (1998), who found that HS are not biodegradable in the presence of small easily available matter. Servais et al., (1985) and Van der Kooij (1982) also found different percentages of BDOC depending on the type of water, with a minimum of BDOC in water containing HS. In our system, between 5% and 50% of the DOC was biodegradable (Fig. 8). Servais et al., (1987) found percentages between 10% and 60% of BDOC. Van der Kooij et al., (1982) found that 27% of carbon was biodegradable in biologically treated wastewater, whereas for lakes or rivers this value decreased to 9 and 2% respectively. It is worth noting that these authors used the *Pseudomonas fluorescens* P17 strain instead of an adapted natural assemblage of bacteria, which underestimates the quantity of BDOC. However, this confirms that the water quality in our system changed as the volume of replacement water decreased. In flow-through systems the percentage of BDOC is equivalent to that found in sewage water or water from polluted rivers (50% of BDOC), while in recirculating systems the water quality is closer to that of river or sea water (10% of BDOC).

If we hypothesize that the HS represents the non biodegradable part of the DOC, the relation between the R-ratio and DOC and the amount of HS in DOC allows us to calculate the amount of biodegradable carbon in the system at each R-ratio investigated.

$$\text{As : } - \text{DOC} = 2.62 \times \ln(R) + 9.69 \text{ (Fig. 4)}$$

$$- \text{HS/DOC} = 0.103 \times R + 0.50 \text{ (Fig. 5) with HS considered as non biodegradable}$$

$$- \text{BDOC} = \text{DOC} - (\text{HS/DOC}) \times \text{DOC}$$

$$\text{Thus : BDOC} = 1.31 \times \ln(R) - 0.269 \times R \times \ln(R) - 0.99 \times R + 4.845$$

Fig. 8 shows values of BDOC that correspond to the last equation for an R-ratio of between 0.06 and 3.5. The quantity of BDOC reached a maximum of $4 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ at an R-ratio equal to $1 \text{ kg} \times \text{m}^{-3}$ and then decreased to $2.5 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ at $3 \text{ kg} \times \text{m}^{-3}$.

Number of heterotrophic bacteria.

The number of free and fixed bacteria was very low compared with other systems and especially with the previous study, where the concentration of bacteria at an R-ratio of 1 was $1.1 \pm 0.3 \times 10^8 \text{ CFU} \times \text{g}^{-1}$ of packing and $7 \pm 2.3 \times 10^4 \text{ CFU} \times \text{ml}^{-1}$ (Leonard et al., 2000). The most

important differences between the two experiments are : (1) the fish biomass, which was between 40 and 80 kg×m⁻³ and 5 and 10 kg×m⁻³ respectively, and (2) the dimension of the biological filters, which were 3 and 0.650 m³ respectively.

Relation between nutrients and number of heterotrophic bacteria.

In relation to the nutrient requirements of heterotrophic bacteria, the bacterial growth rate can be related to the concentration of nitrogen and DOC substratum according to Michaelis –Menten kinetics:

$$\mu = \mu_{\max} \times \frac{[N-NH_3 \text{ or } NO_3]}{([N-NH_3 \text{ or } NO_3] + K_n)} \times \frac{[BDOC]}{([BDOC] + K_s)}$$

where K_n and K_s are the half saturated constant of the bacterial nitrates or ammonia, and BDOC utilization.

The half saturated constants of ammonia and nitrate utilization were 9-29 and 30-160 $\mu\text{g}\times\text{l}^{-1}$ of N-NH₃ and N-NO₃ respectively for many genera of heterotrophic bacteria in the system (Reay et al., 1999). The concentrations of ammonia and nitrates were more than a hundred times higher than their half saturated constants. Thus nitrogen was never a limiting factor.

The half saturated constants of BDOC in the literature lie between 1.2 and 0.0022 mg/l of C (Bois et al, 1997, Billen et al., 1992). This very large spread of values is due to the large variety of the kinds of BDOC. However, the heterotrophic bacteria in our system were almost constant for each R-ratio, which suggests that either the BDOC was never a limiting factor or that the BDOC measured in the water was not the main source of carbon. The fact that in a previous study, performed with the same type of microporous packing, the quantity of bacteria reached 10⁸ CFU×g⁻¹ of packing compared to 3×10⁵ CFU×g⁻¹, proves that fixed bacterial growth was a limiting factor and that BDOC in the water was not the main source of carbon for the fixed bacteria. The only other source of dissolved organic carbon in the system is carbon from particulate matter (fish feces) not eliminated by mechanical filtration (around 50%) and trapped by the biological filter.

CONCLUSION

Our study shows that the concentration of accumulated chemical matter (DOC, humic substances and nitrates) depended on the quantity of replacement water and the amount of ingested feed added to a recirculating system. The nature of the DOC changed as the volume

of replacement water was decreased, and no available carbon was accumulated. The concentration of bacteria (free and fixed) was constant for all ratios studied (ingested feed per replacement water), showing that the quantity of dissolved available carbon was not the limiting factor for heterotrophic bacterial growth. A comparison of the number of fixed bacteria with prior experiments shows that the only other possible source of carbon in the system is that contained in particulate matter trapped in the biological filter. In terms of controlling heterotrophic bacteria population, the quantity of replacement water is not important. What appears to be vital is the quantity of feces reaching the biological filter, which can be reduced by a good mechanical filtration and a good fish feed conversion index.

Acknowledgements

This study was made possible by financial support from the Ministry of Education and Research of Luxembourg, with State grant BFR 96/073.

References

- Almgren, T., Josefsson, B., Nyquist, G., 1975. A fluorescence method for studies of spent sulfite liquor and humic substances in sea water. *Analytica Chimistry Act* 78, 411-422.
- Amador, J.A., Milne, P., Moore, C., Zika, R., 1990. Extraction of chromophoric humic substances from seawater. *Marine chemistry* 29, 1-17.
- Billen, G., Servais, P., Bouillot, P., Ventresque, C., 1992. Functioning of biological filters used in drinking-water treatment- The Chabrol model. *J Water SRT-Aqua* 41, 231-241.
- Bois, F.Y., Fahmy, T., Block, J.C., Gatel, D., 1997. Dynamic modeling of bacteria in a pilot drinking-water distribution system. *Wat. Res.* 31 (12), 3146-3156.
- Corin, N., Backlund, P., Wiklund, T., 1998. Bacterial growth in humic waters exposed to UV-radiation and simulated sunlight. *Chemosphere* 36 (9), 1947-1958.
- Harvey, G., Boran, D. A., Chesal, L.A., Tokar, J.M., 1983. The structure of marine fulvic and humic acids. *Marine Chemistry* 12, 119-132.
- Heinen, J.M., Hankins, J.A., Adler, P.R., 1996. Water quality and waste production in a recirculating trout culture system with feeding of higher energy or lower energy diet. *Aqualcult. Res.* 27, 699-710.
- Hirayama, K., Mizuma, H., Mizue, Y., 1988. The accumulation of dissolved organic substances in closed recirculating culture systems. *Aquacultural Engineering* 7, 73-87.

- Hirayama, K., 1974. Water control by filtration in closed culture systems. *Aquaculture* 4, 369-85.
- Ishiwatari, R., 1992. Macromolecular material (humic substance) in the water column and sediments. *Marine Chemistry* 39, 151-166.
- Kogure, K., Simidu, U., Taga, N., 1979. A tentative direct microscopic method for living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 25, 415-420.
- Kooij van der, D., Visser, A., Hijnen, W.A.M., 1982. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *J.AWWA* , 540-545.
- Lemarié, G., Martin J.L., Dutto, G., Garidou, C., 1998. Nitrogenous and phosphorus waste productions in a flow-through land-based farm of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquacult. Living Resour.* 11, 247-254.
- Leonard, N., Blancheton, J.-P., Guiraud, J.P., 2000. Population of heterotrophic bacteria in an experimental recirculating system. *Aquacult. Eng.* 22, 109-120.
- Ogura, N., 1977. High molecular weight matter in seawater. *Marine Chemistry* 5, 535-49.
- Pagand, P., Blancheton, J.P., Casellas, C. 2000. A model for predicting the quantities of dissolved inorganic nitrogen released in effluents from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) recirculating water system. *Aquacult. Eng.* 22, 137-153.
- Peele, E.R., Colwell, R.R., 1981. Application of a direct microscopic method of enumeration of substrate-responsive marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology.* 27, 1071-1075.
- Reay, D., David, B., Nedwell, J., Priddle, J., Cynan, E.E., 1999. Temperature dependence of inorganic nitrogen uptake: reduced affinity for nitrate at suboptimal temperatures in both Algae and Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2577-2584.
- Servais, P., Billen, G., Rego, J.V., 1985. Rate of bacterial mortality in aquatic Environments. *Applied and Environmental Microbiology* 49 (6), 1448-1454.
- Singh, A., Fei-Peng, Y., McFeters, G.A., 1990. Rapid detection of Chlorine-Induced Bacterial Injury by the Direct Viable Count Method Using Image Analysis. *Applied Environmental Microbiology* 56 (2), 389-394.
- Takeda, S., Kiyono, M., 1990. The characterisation of yellow substances accumulated in a closed recirculating system for fish culture. Biology Department, Central Research Institute of Electronic Power Industry, Abiko 1646, Chiba 270-11, Japan.
- Tiews, K., 1981. *Aquaculture in Heated Effluents and Recirculation Systems Vol. 1 and 2*, Heenemann Verlagsgesellschaft, Berlin.

Treguer, P., Le Corre, P., 1974. Manual d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer. Utilisation de l'autoanalyseur II, Technicon ®, Université de Bretagne Occidentale (Publisher), Brest France. 110.

Table n°1: Characterization of the different components of the recirculating system

Table n°2: Optical properties of humic substances.

Table n°3 : Linear relation between the chemical parameters and R, or ln (R) for DOC.

Table n°4: Different methods for quantifying humic substances.

Figure n°1: Fish farming system. System components are described in Table 1.

Figure n°2: Gel filtration chromatogram of humic substances.

Figure n°3: Humic substances versus R-ratio.

Figure n°4: DOC versus R-ratio.

Figure n°5: Proportion of humic substances in DOC versus R-ratio.

Figure n°6: DIN versus R-ratio.

Figure n°7: Number of heterotrophic bacteria versus R-ratio.

Figure n°8: BDOC and growth rate versus R-ratio.

Numbers on the Figure 1	Components	Functions	Characteristics
1	Fish tank	2 Rearing tanks	4m ³ each tank
2	Particle separator	Feces and uneaten feed collection	fecal trap
3	Mechanical filter (50 µm)	removal of small particles	mesh filter
4	Packed column	CO ₂ stripping and (≥6 mg l ⁻¹)	counter current air/water packed column
5	Pumping tank	- pH regulation at 7.6 - replacement water adding	adjunction of NaOH
6	Pump		10m ³ h ⁻¹
7	UV disinfection unit	Bacteria control	20Watts
8	Biological filter	Nitrification	0.6m ³ microporous packing: Biogrog
9	Heat exchanger	Thermo-regulation: 22±1°C	

Table n°1: Characterization of the different components of the recirculating system

Optical properties	
Optical density increasing (nm)	from 400 to 200
Maximum emission spectra Fluorescence (nm)	470
Maximum excitation spectra Fluorescence(nm)	370

Table n°2: Optical properties of humic substances.

	parameters	values	lower limit (95%)	upper limit (95%)	associated probability	n
DIN	a	40.6	37.92	43.39	<0.0001	28
	b	6.99	1.78	12.00	0.01	
	r ²	0.97				
DOC	a	2.62	2.03	3.21	<0.0001	29
	b	9.69	8.91	10.46	<0.0001	
	r ²	0.75				
HS	a	0.026	0.023	0.028	<0.0001	31
	b	0.016	0.010	0.021	<0.0001	
	r ²	0.93				
HS/DOC	a	0.103	0.068	0.137	<0.0001	23
	b	0.50	0.043	0.57	<0.0001	
	r ²					

Table n°3: linear relation between the chemical parameters and R, or ln (R) for DOC.

authors	absorbency	fluorescence		kind of water
	λ (nm)	$\lambda_{excitation}$ (nm)	$\lambda_{emission}$ (nm)	
Kieber et al., 1997		360	490	HS: Aldrich Chemical or Fisher Scientific sea water
Miller and Moran (1997)		360	490	sea water supplemented with HS: amberlite XAD-8 resin
Misra et al., 1996		340	498.6	Aldrich Chemical in fresh water
Vidar and Hongve (1994)	254			Baerum water (fresh water)
Gjessing and Källqvist (1991)	254			natural humic-rich water (Hellerud, fresh water))
Takeda et al., (1990)	increasing from 500 to 200	350	450	aquarium recirculating sea water
Hirayama et al., 1988	260	360	430	
Gillbricht (1980)	230 to 250			sea water
Otte et al., 1977	315			recirculating sea water

Table n°4: Different methods to quantify humic substances.

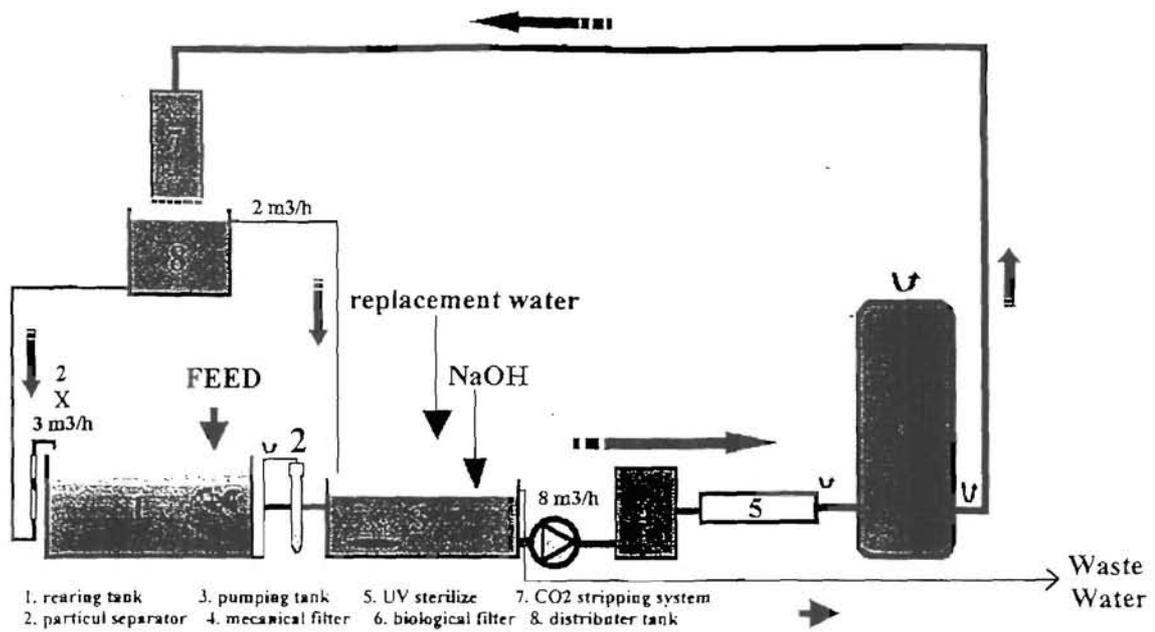


Figure n°1: Fish farming system. System components are described in Table 1.

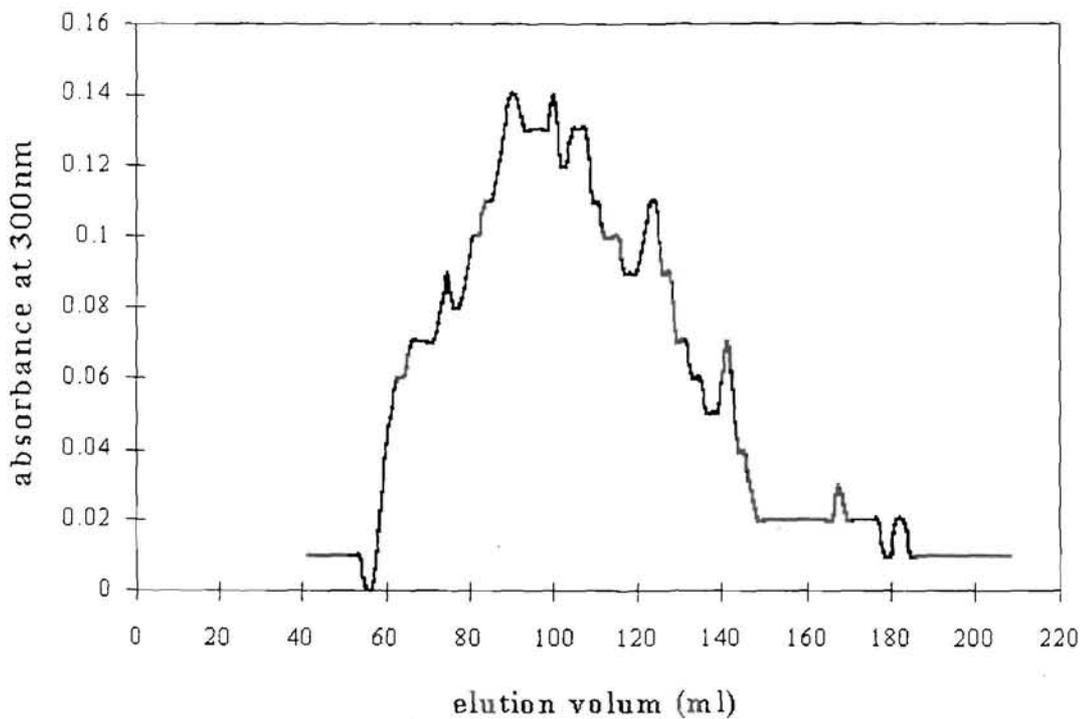


Figure n°2: Gel filtration chromatogram of humic substances.

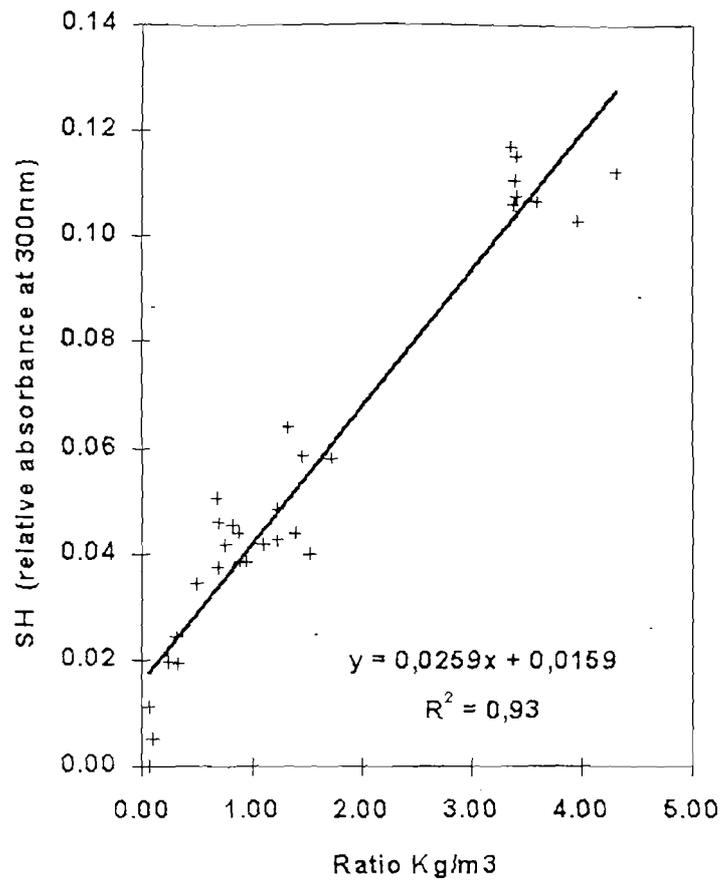


Figure n°3: Humic substances versus R-ratio.

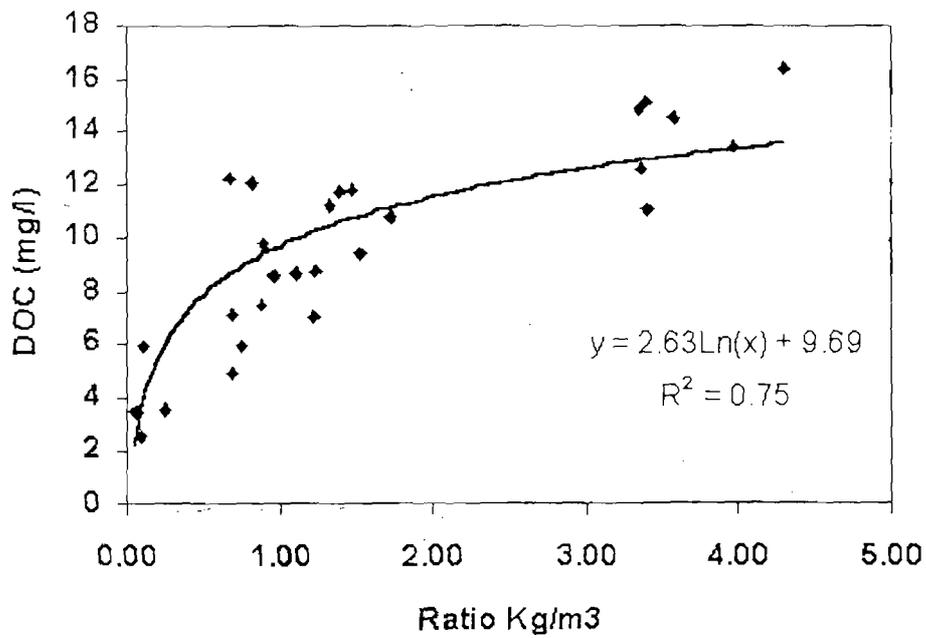


Figure n°4: DOC versus R-ratio.

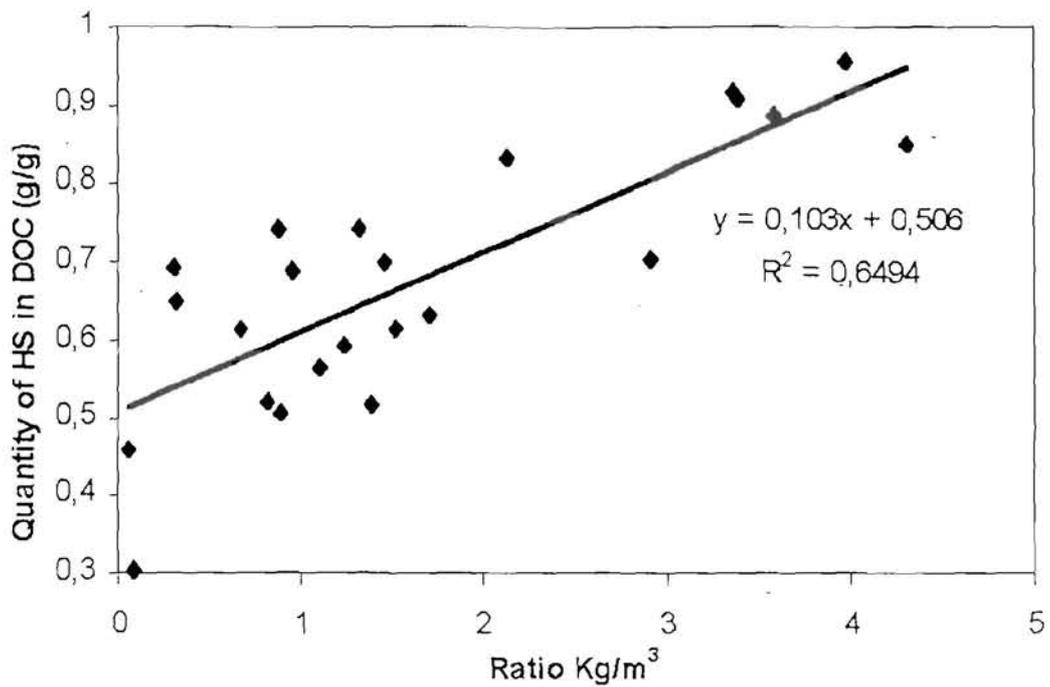


Figure n°5: Proportion of humic substances in DOC versus R-ratio.

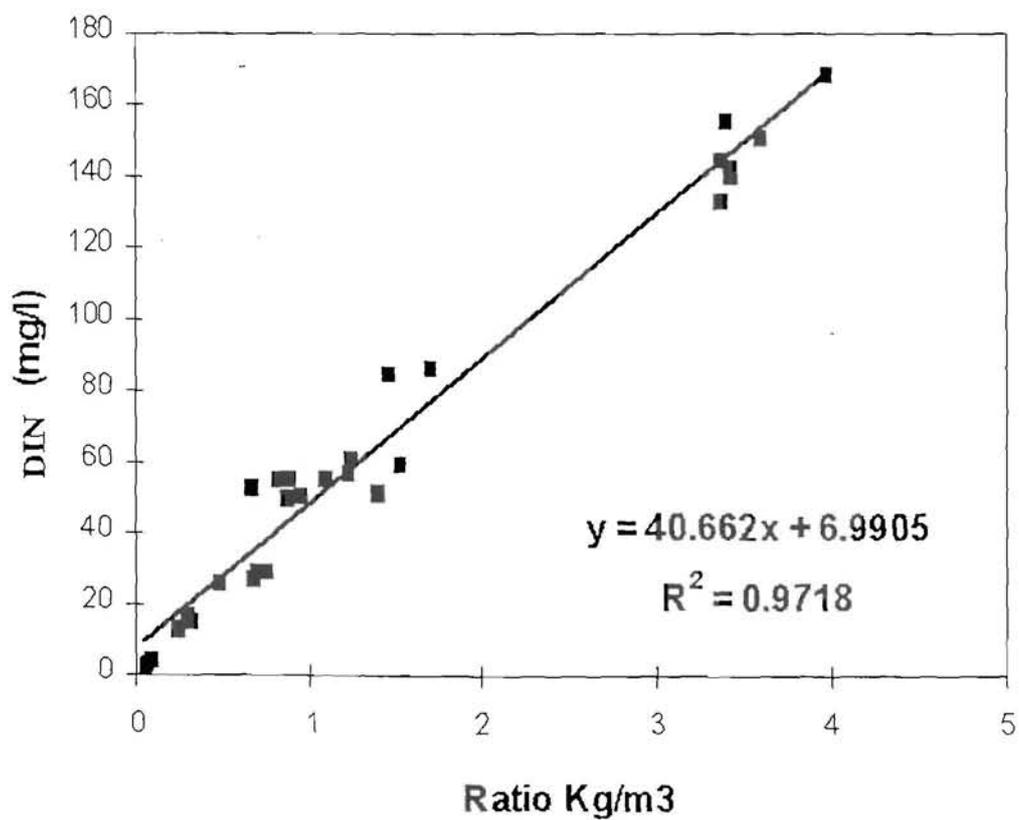


Figure n°6: DIN versus R-ratio.

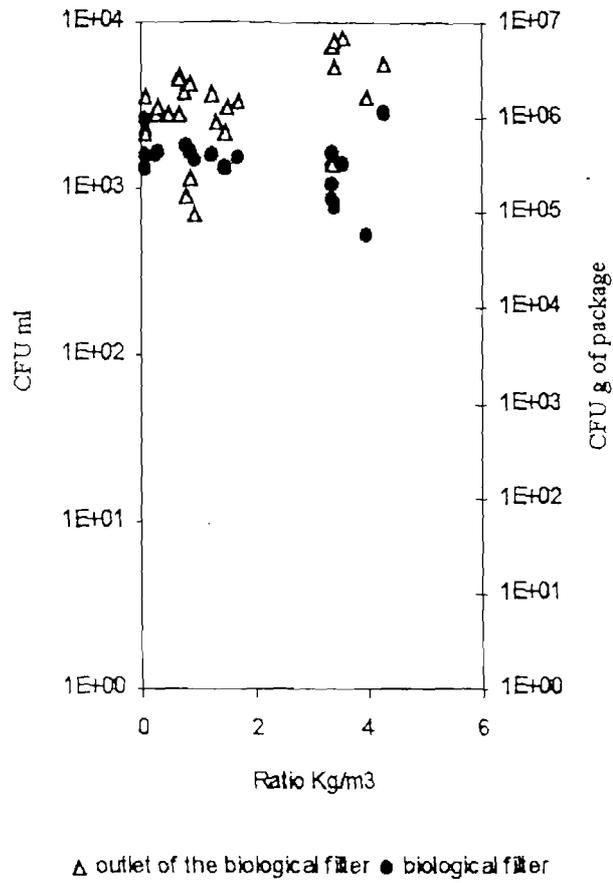


Figure n°7: Number of heterotrophic bacteria versus R-ratio.

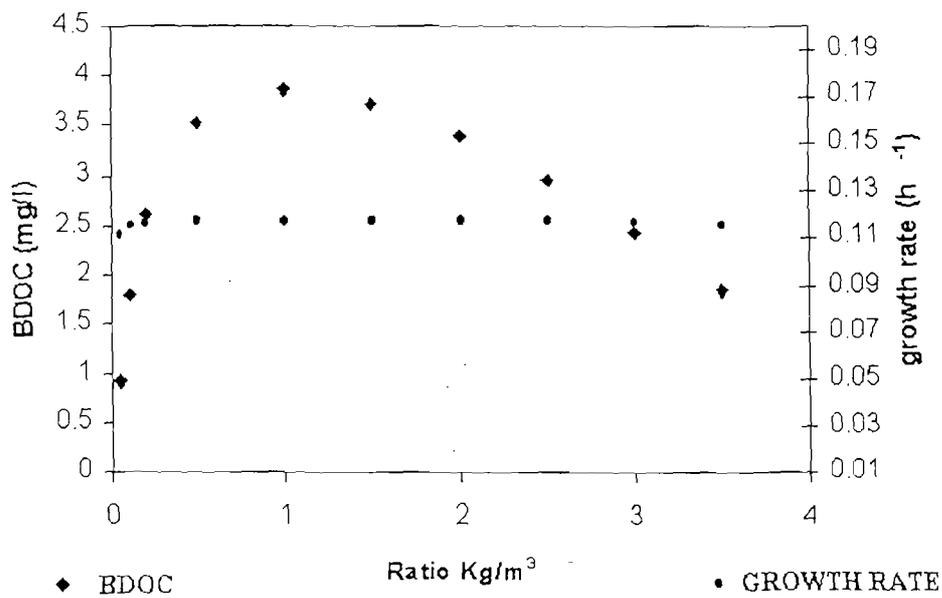


Figure n°8: BDOC and growth rate versus R-ratio.

ANNEXE 3.2. :
ANALYSES CHIMIQUES DU PRELEVEMENT DE L'EAU D'ELEVAGE AU MOMENT DU
PRELEVEMENT DE SH.

L'azote et le carbone organique dissous ont été mesurés l'échantillon. Le tableau ci dessous présente les résultats obtenus.

Tableau : Analyses de Carbone et d'azote inorganique.

Analyse	Echantillon 2
Ammoniaque (mg.l ⁻¹ N-NH ₃)	1,564
Nitrites (mg.l ⁻¹ de N-NO ₂)	0,577
Nitrates (mg.l ⁻¹ de NO ₃)	37,340
Azote total (mg.l ⁻¹ de N)	39,481
Azote organique dissous (mg.l ⁻¹ de N organique)	1,454
Carbone organique dissous (mg.l ⁻¹)	6,93
Extrait sec (mg.l ⁻¹)	81,3

ANNEXE N°3.3.

CARACTERISTIQUES STATISTIQUES DES REGRESSIONS LINEAIRES.

Tableau : Caractéristiques statistiques des régressions linéaires entre R et AT, HS et HS/DOC et ln(R) et DOC et P-PO₄³⁻.

	Paramètres	Valeurs	Limite inf. (95%)	Limite sup. (95%)	Probabilité	n
AT	a	40,6	37,92	43,39	<0,0001	28
	b	6,99	1,78	12,00	0,01	
	r ²	0,97				
DOC	a	2,62	2,03	3,21	<0,001	29
	b	9,69	8,91	10,46	<0,001	
	r ²	0,75				
HS	a	0,0026	0,023	0,028	<0,001	31
	b	0,016	0,010	0,021	<0,001	
	r ²	0,93				
HS/DOC	a	0,103	0,068	0,137	<0,001	23
	b	0,50	0,043	0,57	<0,001	
	r ²	0,65				
P-PO ₄ ³⁻	a	1,018	0,82	1,21	<0,001	26
	b	2,82	2,55	3,09	<0,001	
	r ²	0,817				

ANNEXE N°6.1.

PARAMETRES ZOOTECHNIQUES DES POISSONS DANS LES CIRCUITS OZONE ET TEMOIN.

Ce tableau présente les taux de croissance journaliers, les indices de conversion et les taux d'alimentation des poissons des quatre bassins expérimentaux (les deux bassins témoin et les deux bassins du circuit soumis au traitement d'ozonation).

Périodes	TCJ (% par jour)				IC				TAJ (% par jour)			
	Témoin		Ozonation		Témoin		Ozonation		Témoin		Ozonation	
1	0,69	0,60	0,50	0,59	1,61	1,73	2,02	1,85	0,98	0,92	0,90	0,97
2	0,60	0,63	0,52	0,63	1,54	1,39	1,44	1,34	0,93	0,87	0,74	0,85
3	0,51	0,50	0,48	0,62	1,24	1,27	1,36	1,18	0,62	0,64	0,66	0,72
4	0,15	0,22	0,22	0,29	2,15	2,03	2,18	1,73	0,32	0,45	0,48	0,49

ANNEXE N°7.1.

CIRCUIT EXPERIMENTALE POUR DETERMINER LA CONSTANTE DE DETACHEMENT

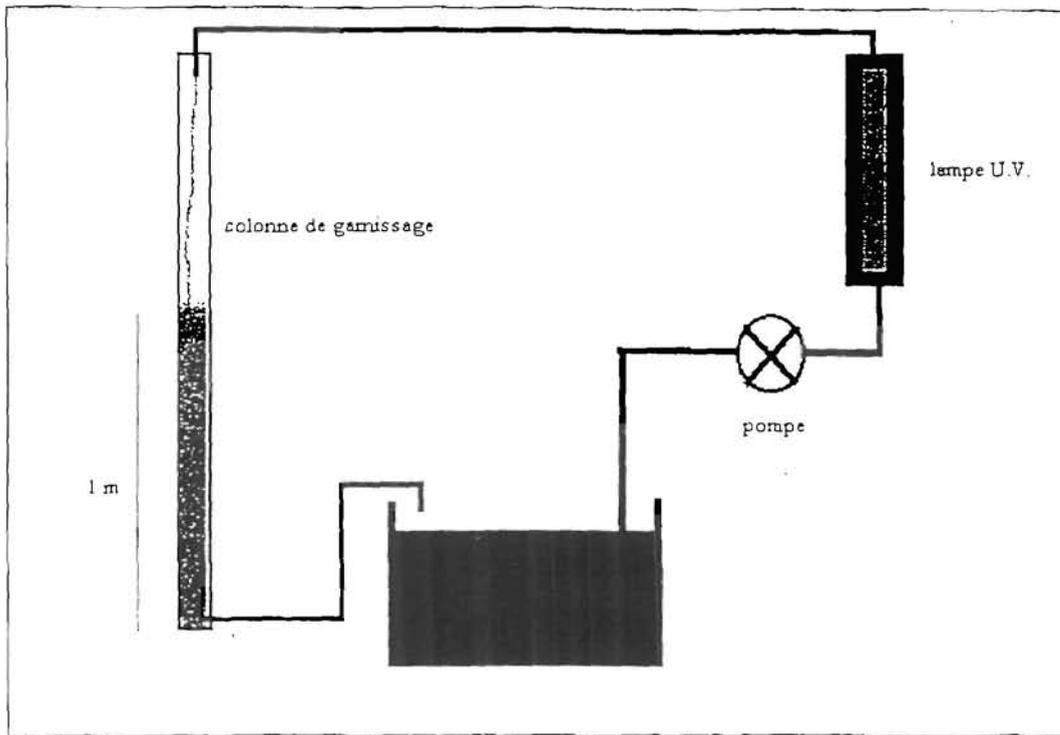


Figure. Circuit expérimental pour déterminer k_{det} .

Figure

ANNEXE N°7.2.

CIRCUIT EXPERIMENTALE POUR DETERMINER LA CONSTANTE DE FIXATION

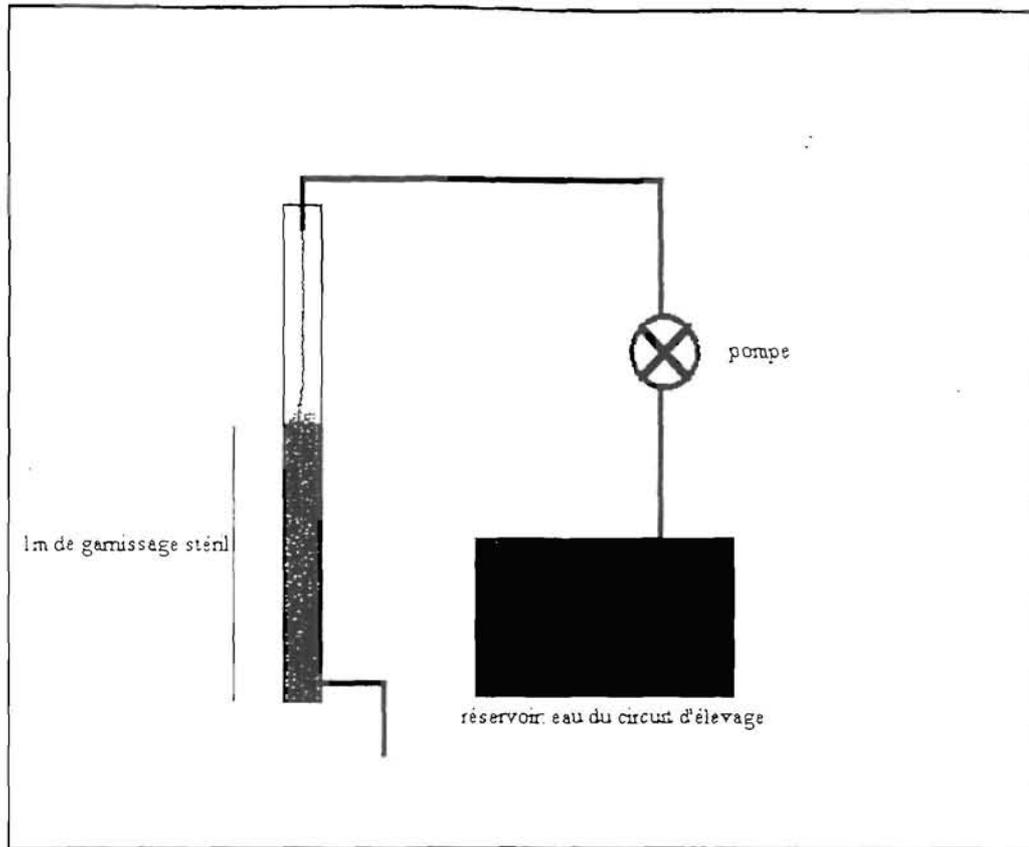


Figure. Circuit utilisé pour déterminer k_{fx} .