

# TECHNIQUES DE CULTURES AXÉNIQUES D'ORGANISMES PLANCTONIQUES : UN ROTIFÈRE, *BRACHIONUS PLICATILIS* ET UNE ALGUE, *PLATYMONAS (= TETRASELMIS) SUECICA*

Constantin KOUTSIKOPOULOS

IFREMER, B.P. 1049 - 44037 Nantes Cedex, France.

## Abstract

BACTERIA-FREE CULTURES OF PLANKTONIC ORGANISMS : ROTIFERS, *BRACHIONUS PLICATILIS* AND ALGAE *PLATYMONAS (= TETRASELMIS) SUECICA*.

The efficiency of different methods for the purification and maintenance of axenic cultures of a rotifer and an unicellular alga is tested. The use of antibiotics seems to be the most suitable method to realise bacteria-free cultures of plankton. No elements prove that the presence of bacteria is necessary for the development of the cultures. Bacteria-free cultures show a physiological evolution if the culture medium is enriched with some nutrients.

## Résumé

L'efficacité des différentes méthodes pour la décontamination et la maintenance de cultures axéniques d'un rotifère et d'une algue unicellulaire est testée. Les méthodes utilisant des antibiotiques semblent être les plus appropriées pour l'axénisation des organismes planctoniques. La présence des bactéries dans les cultures n'est pas nécessaire pour leur évolution. Le développement des cultures axéniques est physiologique si le milieu de culture est enrichie avec des éléments nutritifs.

## Introduction.

Les études, concernant les animaux sans germes (axéniques), ont mis en évidence l'importance de la microflore dans le domaine nutritionnel et pathologique. L'intérêt de l'étude des relations entre les organismes utilisés dans les élevages intensifs, et leur microflore associée, est d'autant plus grand que les organismes sont placés dans les premiers stades de la chaîne alimentaire. Mis à part leurs propriétés pathologiques, les bactéries agissent aussi dans le transfert d'éléments nutritifs tout au long de la chaîne alimentaire (FONG et MAN, 1980).

Le rotifère *Brachionus plicatilis* Müller est l'une des proies vivantes les plus fréquemment utilisées dans l'élevage des jeunes stades des larves de poissons. La fragilité de ces stades a provoqué de nombreuses études sur la qualité nutritionnelle des rotifères. Les cultures axéniques sont devenues un outil indispensable pour ces expériences. Dans la littérature, les références sur les procédures d'axénisation des algues unicellulaires sont anciennes, nombreuses et diversifiées (SPENCER, HUNTER et McVEIGH, 1961 ; DROOP, 1967, UKELES, 1975 ; BALDINGER, 1979). La majorité fait appel aux antibiotiques. Pour le zooplancton, essentiellement des rotifères, plusieurs auteurs ont obtenu des cultures axéniques (NATHAN et LADERMAN, 1959 ; DROOP et SCOTT, 1978 ; HIRAYAMA *et al.*, 1979). La seule méthode utilisée est la décontamination des œufs parthénogénétiques.

Dans la présente étude, les mêmes expériences ont été tentées sur une algue, *Platymonas (= Tetraselmis) suecica* Kylin et sur un rotifère, *Brachionus plicatilis*. L'axénisation des algues aura un intérêt secondaire et elle sera examinée dans le contexte de leur utilisation dans les cultures des rotifères. Par la suite, la décontamination directe des rotifères adultes et l'étude de la toxicité des antibiotiques et de certains antisept-

tiques sur ces organismes ont été testées. Une étude élémentaire de la croissance des algues axéniques et gnothoxéniques a été réalisée afin d'avoir quelques éléments sur le rôle des bactéries dans l'évolution des cultures et surtout pour suivre leur évolution car elles ont été utilisées comme nourriture des rotifères.

### **Matériel et méthodes.**

Les rotifères, *Brachionus plicatilis* et les algues, *Platymonas* (= *Tetraselmis*) *suecica* proviennent de cultures existantes, produites dans le Département Biologie, Aquaculture, Pêche du Centre de Brest (IFREMER). La composition des milieux de cultures, milieu d'Oppenheimer et Zobell pour les bactéries, milieu de Walne pour les algues unicellulaires et aliment inerte (PM1) pour les rotifères, est présentée dans l'annexe. L'antiseptique utilisé est essentiellement constitué d'ammoniums quaternaires, et les antibiotiques employés, ainsi que leur code, sont indiqués ci-après :

Ampicilline	Amp	Kanamycine sulfate	Kan
Chloramphénicol	Cmp	Néomycine	Neo
Erythromycine base	Ery	Oxytétracycline	Oxt
Fluméquine	Flu	Pénicilline-G	Pen-G
Furadoïne	Fur	Streptomycine sulfate	Str

Les méthodes pour l'axénisation des rotifères et des algues seront exposées séparément à cause des différences considérables dans les relations entre les bactéries et l'hôte pour ces deux niveaux trophiques. Les appareils nécessaires pour des opérations spécifiques seront décrits avec les méthodes concernées.

#### **Axénisation de rotifères (*Brachionus plicatilis*).**

##### *A partir des œufs parthénogénétiques.*

La méthode suivie par la majorité des auteurs est la récolte des œufs parthénogénétiques et l'incubation dans un milieu contenant un mélange d'antibiotiques. Le choix des antibiotiques est basé sur leur mode d'action.

Dans la présente étude, nous avons choisi les antibiotiques en effectuant préalablement un antibiogramme sur le milieu de culture des rotifères. Les antibiotiques Flu, Neo, Cmp, Ery ont été retenus. Nous avons ajouté la Fur car elle est efficace sur de nombreuses bactéries marines. L'efficacité de chaque antibiotique et des combinaisons de 2 à 5 antibiotiques sur la microflore d'élevage, en concentration finale de 8 à 16 µg/ml, a été testée (mélange 1 : Neo 8 µg/ml, Cmp 16 µg/ml, Ery 8 µg/ml, Fur 10 µg/ml, Flu 16 µg/ml). Le développement bactérien est ensuite observé pendant une semaine à 20 ± 1° C.

Pour l'axénisation proprement dite, un « concentré » de *Brachionus* a été réalisé par passage à travers un filet à plancton de 80 µm. Le lavage des rotifères, contenus dans le filet, sert d'une part à éliminer l'ensemble des algues agglutinées et des protozoaires parasites développés dans la culture, et d'autre part à détacher les œufs des individus adultes. A chaque répétition de l'expérience, nous avons récolté 3 lots de 30 œufs. Afin de vérifier l'influence des antibiotiques sur la survie des œufs, nous avons incubé deux lots traités et un lot-témoin.

Après 20 à 40 heures d'incubation dans des boîtes de Pétri (température de 20 ± 1° C et photopériodique naturelle), les éclosions ont eu lieu. Les individus vivants sont alors récoltés à l'aide d'une pipette Pasteur et ils sont transférés dans un milieu saumâtre. Après 24 heures, un test de stérilité dans le milieu d'Oppenheimer et Zobell a été réalisé. L'addition d'eau distillée dans les boîtes est effectuée régulièrement pour remplacer l'eau évaporée.

Pour l'étude de l'action des antiseptiques, l'incubation des germes libres dans l'élevage des rotifères dans un milieu contenant des ammoniums quaternaires (concentration finale 0,01 %) a été effectuée pendant 1, 3, 5 et 13 mn. Le test de stérilité dans le milieu d'Oppenheimer et Zobell a été effectué après des dilutions successives du milieu incubé, afin de diminuer encore la concentration et d'éviter ainsi toute inhibition de l'antiseptique dans le milieu de culture. Ensuite, l'action des ammoniums quaternaires, de même concentration et pour des durées d'incubation identiques, a été étudiée sur des lots de 30 œufs parthénogénétiques.

##### *A partir des individus adultes.*

L'axénisation des individus adultes associés à une microflore réduite (après contamination accidentelle d'un lot de rotifères axéniques) a été réalisée en utilisant de fortes doses d'un mélange de Pen-G/Str et Kan. Ensuite, à partir de ces résultats, nous avons étudié l'influence d'un mélange de quatre antibiotiques

en fonction de leur concentration et de la durée d'incubation sur les individus adultes. Les rotifères ont été incubés dans des séries de cinq tubes contenant un mélange d'antibiotiques (Pen-G, Str, Kan, Amp ; la composition exacte est présentée dans le tableau 3). Après 1, 4 et 13 jours d'incubation, les individus ont été repiqués dans des tubes contenant des algues unicellulaires vivantes. Après 5-6 jours d'incubation pour vérifier que leur capacité de reproduction n'a pas été affectée, nous avons effectué un test de stérilité.

#### **Axénisation des algues unicellulaires (*Platymonas suecica*).**

Pour le choix des antibiotiques, un antibiogramme a été réalisé sur une culture d'algues, comme pour les rotifères. Simultanément, nous avons testé l'action des différents antibiotiques sur les algues, en variant la concentration et le temps d'incubation. Des combinaisons des différentes concentrations de Pen-G 10-20 UI/ml, Str 10-20  $\mu\text{g/ml}$ , Cmp 40-80  $\mu\text{g/ml}$ , Fur 30-60  $\mu\text{g/ml}$  et Kan 10-20  $\mu\text{g/ml}$  ont été réalisées. Des repiquages ont été effectués après 1, 5 et 13 jours d'incubation sous un éclairage continu et une température de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Dès la repousse des algues (vérification du pouvoir reproductif) la stérilité a été vérifiée.

L'incubation des algues dans une solution d'ammoniums quaternaires (concentration finale 0.01 %) pendant 14 mn a été réalisée. Après observation au microscope et repiquage, la viabilité et la stérilité ont été vérifiées.

La chaleur a été employée comme méthode de réduction de la microflore des algues. Une incubation de 10 mn à  $50^\circ\text{C}$  a été réalisée. Selon UKELES (1975), les algues *Platymonas* sp. résistent quelques minutes à  $40^\circ\text{C}$  et à  $50^\circ\text{C}$  une diminution significative (90-95 %) du nombre des bactéries peut être réalisée (ZOBELL et LONG, 1937).

#### **Production et conservation des cultures axéniques de deux organismes.**

Les souches axéniques des algues ont été conservées dans des tubes de 10 ml en utilisant le milieu nutritif de Walne (1 ml/l ; voir annexes) et en faisant des repiquages successifs tous les 20-25 jours. Pour les rotifères, différentes méthodes de conservation, en petites quantités avec l'utilisation d'une nourriture vivante ou un aliment inerte et/ou en basse température ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ), ont été testées. Leur efficacité sera présentée dans les résultats.

Pour les cultures axéniques des algues et des rotifères en volumes de 2 litres, nous avons mis au point l'ensemble présenté dans la figure 1. L'air comprimé filtré est indispensable. Il provoque un courant dans le ballon de rotifères et empêche ainsi les algues de se fixer sur la paroi du récipient. Les rotifères se nourrissent par filtration et l'existence du courant facilite la capture de leur nourriture (DROOP et SCOTT, 1978). Les ballons sont posés directement sur le boîtier des lampes pour augmenter la luminosité et la température à  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ . A cette température, les algues montrent une croissance égale ou supérieure à celle obtenue à  $20,5^\circ\text{C}$  (UKELES, 1975) et le rythme de croissance des rotifères est augmenté également.

#### **Croissance des algues.**

Une étude élémentaire de la croissance de trois types de cultures d'algues a été réalisée. Ces cultures sont : algues axéniques incubées dans de l'eau de mer stérile enrichie avec du milieu nutritif de Walne, algues gnothoxéniques (réassociées aux bactéries) incubées dans le même milieu et algues axéniques incubées dans un filtrat (millipore 0,22  $\mu\text{m}$ ) d'une culture déjà existante. Cette dernière série a été réalisée afin d'étudier la présence des substances qui pourraient influencer la croissance des algues (FOGG, 1966). Pour la réception des germes associés aux algues, la culture est passée à travers un filtre millipore de 1,2  $\mu\text{m}$  et le filtrant est récupéré après vérification au microscope de la présence des bactéries.

Deux expériences ont été réalisées. Dans la première, le rythme de la croissance a été comparé pour les trois types de culture. La concentration du milieu nutritif de Walne était de 1,5 ml/l. Pour la deuxième expérience, les algues axéniques et les algues réassociées aux bactéries ont été incubées dans une concentration initiale du milieu nutritif à 0,7 ml/l. Après 12 jours d'incubation, nous avons ajouté du milieu nutritif (concentration finale de 1,8 ml/l pour connaître l'influence de la quantité des éléments nutritifs sur le rythme de la croissance des algues avec et sans bactéries. Pour cette expérience, les bactéries ont été comptées sur milieu solide d'Oppenheimer et Zobell. L'incubation a été réalisée à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  sous un éclairage continu. Le comptage des algues a été fait à l'aide d'une cellule de Malassez. Pour les fortes densités, un sous-échantillonnage par dilution a été effectué afin que le nombre compté se situe entre 100 et 500.

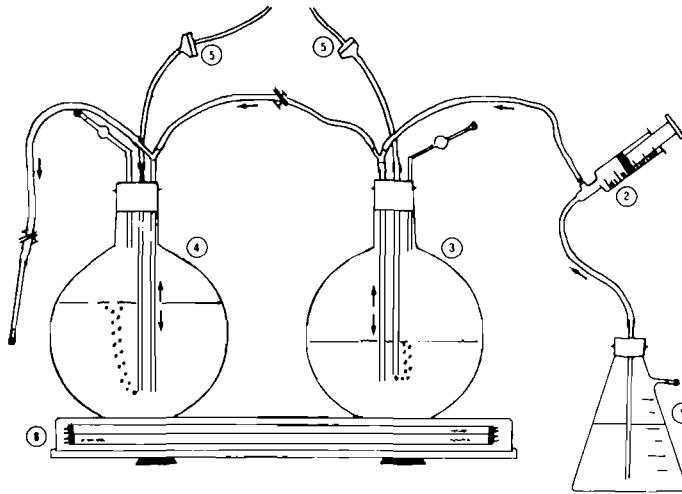


FIG. 1. — L'ensemble utilisé pour les cultures en grand volume (tout le matériel et les milieux sont stériles) :

1. Flacon de 1 l avec solution de milieu nutritif pour algues.
2. Seringue de 50 ml avec un ensemble de valves à sens unique.
3. Ballon de 2 l pour la culture d'algues.
4. Ballon de 2 l pour les rotifères.
5. Filtre Millipore (0,22  $\mu$ m) pour stériliser l'air comprimé.
6. Ensemble de deux lampes néon (60 cm).

The apparatus used for the axenic cultures (all equipment, media and other materials are sterile) :

1. 1 l flask containing the culture medium.
2. Syringe with a one way valves apparatus.
3. 2 l culture container for the algae.
4. 2 l culture container for the rotifers.
5. Filter for the compressed air (Millipore 0,22  $\mu$ m).
6. Two fluorescent tubes (60 cm).

## Résultats.

### Axénisation des rotifères.

#### *Action des substances antibactériennes sur les œufs de rotifères.*

Les différents mélanges d'antibiotiques testés n'ont pas empêché tout développement bactérien du milieu d'élevage de rotifères. Il a fallu recourir à une combinaison de 5 antibiotiques (mélange 1 : Neo 8  $\mu$ g/ml, Cmp 16  $\mu$ g/ml, Ery 8  $\mu$ g/ml, Fur 10  $\mu$ g/ml, Flu 16  $\mu$ g/ml) pour inhiber toute croissance bactérienne. L'expérience a été répétée avec ce mélange et seulement dans 20 % des cas nous n'avons pas réussi à obtenir des rotifères axéniques. Les échecs semblent dus à des contaminations accidentelles, car un seul des deux lots traités de la même manière et simultanément n'était pas décontaminé.

Le tableau 1 présente les variations du taux d'éclosion pour les échantillons traités ou non. Les différences ne sont pas significatives (test de Krustal-Wallis,  $P > 0,05$ ). Même après 3 jours d'incubation avec le mélange, nous avons observé des éclosions. Contrairement aux expériences de HIRAYAMA *et al.*, 1979, ce traitement ne semble pas modifier l'activité physiologique des organismes.

L'action des ammoniums quaternaires, à une concentration de 0,01 % sur les germes présents dans la culture des rotifères, a été étudiée. Le temps minimum d'incubation pour arriver à une décontamination du milieu est de 13 mn. Cependant, dans ces conditions, comme le montre le tableau 2, les œufs ne sont pas viables.

#### *Action des antibiotiques sur les rotifères adultes.*

L'essai de décontamination des individus adultes avec l'utilisation de fortes doses d'antibiotiques et une incubation prolongée a donné des résultats intéressants, tout au moins pour la résistance des rotifères. Les antibiotiques ont été choisis selon leur mode d'action (phénomènes de synergie et d'antagonisme, HERWIG, 1979). Les plus actifs, selon les résultats de l'antibiogramme, n'ont pas été utilisés car un premier test sur les algues a montré que des fortes doses empêchent la croissance. Les concentrations utilisées et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.

DROOP et SCOTT, 1978, ont utilisé des doses voisines sur les œufs des rotifères. La concentration de l'échantillon 5 est létale pour les rotifères et celle de l'échantillon 4 devient létale pour une incubation prolongée.

### Axénisation des algues unicellulaires.

Le test préliminaire sur l'action de chaque antibiotique a montré que le chloramphénicol et la furadoïne, à des doses supérieures à 150  $\mu$ g/ml et pour une action prolongée, empêchent la croissance des algues. Les premiers essais de décontamination avec des concentrations d'antibiotiques de 8 à 16  $\mu$ g/ml ont échoué. Ainsi, nous avons augmenté les doses de Cmp, Fur, Kan, Pen-G, Str et la durée d'incubation à des niveaux qui n'ont pas affecté la viabilité des algues. Les mélanges utilisés et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4. L'incubation pendant 10 mn à 50° C ou de 14 mn avec 0,01 % d'ammoniums quaternaires a affecté le mécanisme de reproduction des cellules.

Date d'expérience	Taux d'éclosion (%)		
	AB <sub>1</sub>	AB <sub>2</sub>	T
9-11-81	53,3	29,2	40
17-11-81	51	68,5	66,6
23-11-81	52,4	56	75,9
24-11-81			53,3
30-11-81	47,8	63,6	70,8
1-12-81			74,1
7-12-81	64,3	72,4	56,5
14-12-81	52,6		70

TABL 1. — Taux d'éclosion pour les échantillons de rotifères AB<sub>1</sub> et AB<sub>2</sub> traités avec le mélange 1 d'antibiotiques et le lot-témoin (T) non traité.

Percentage of hatching for the eggs incubated in a mixture of antibiotics (series AB<sub>1</sub> and AB<sub>2</sub>) and the sample (T) without antibiotics.

Anti-septique	Concentration (%)	Incubation Durée (mn)	Bactéries viables	Oeufs viables
Ammoniums quaternaires	0,01	1	+	+
» » »	0,01	3	+	+
» » »	0,01	5	+	+
» » »	0,01	13	—	—

TABL 2. — Influence des Ammonium quaternaires sur les bactéries et les œufs des rotifères : + présence, — absence.

Influence of the Ammonium quaternaires on bacterias and eggs of the rotifers : + presence, — absence.

TABL 3. — Influence des antibiotiques sur la survie des bactéries et des rotifères : + présence, — absence. C.i. concentration initiale.

▼ Influence of the antibiotics on the survival of bacterias and adult rotifers : + presence, — absence. C.i. initial concentration.

Durée d'incubation	C.i. : Pen-G 400 Ul.ml <sup>-1</sup> ; Str 360 Ul.ml <sup>-1</sup> ; Amp 100 µg.ml <sup>-1</sup> ; Kan 100 µg.ml <sup>-1</sup>	Echant. 1	Echant. 2	Echant. 3	Echant. 4	Echant. 5
		C.i. × 1	C.i. × 2	C.i. × 4	C.i. × 8	C.i. × 16
1 jour	Bact. viables Rotif. viables	+	—	—	—	—
4 jours	Bact. viables Rotif. viables	+	+	+	+	—
13 jours	Bact. viables Rotif. viables	+	+	+	—	—

### Comparaison de la croissance des algues axéniques et holoxénisées.

Les figures 2, 3 et 4 présentent l'évolution des cultures axéniques réassociées aux bactéries, pour différentes concentrations d'éléments nutritifs. En général, l'évolution est identique pour ces deux types de culture. La présence d'un extrait de culture d'algues (échant. 5, 6), de la première expérience (fig. 2), n'a pu modifier le rythme de la croissance.

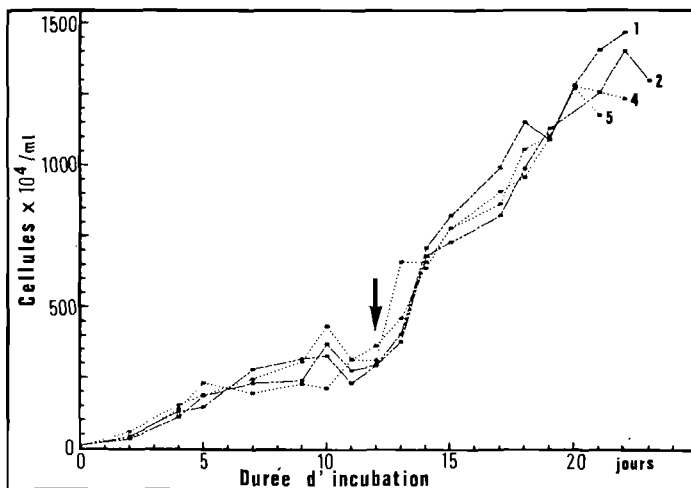
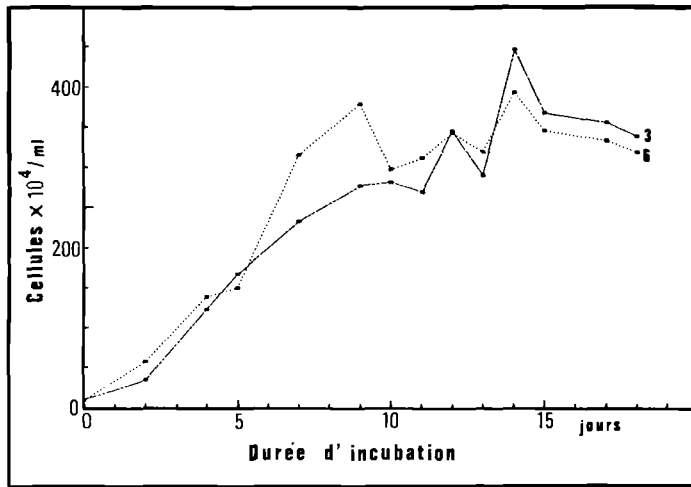
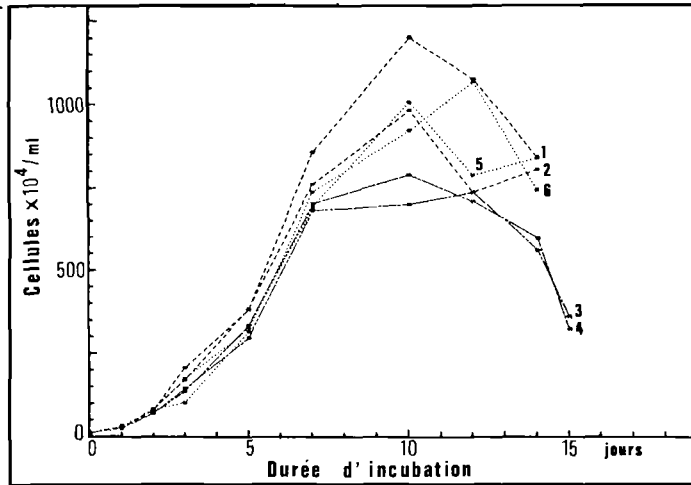
Les figures 3 et 4 montrent bien que la concentration des éléments nutritifs limite l'évolution des cultures. L'addition d'une quantité supplémentaire de milieu nutritif (fig. 4) a provoqué le redémarrage et la modification du rythme de la croissance. Le comptage du nombre des bactéries au cours de cette deuxième expérience (fig. 5) a montré que leur croissance était parallèle à celle des algues (PRIEUR et LE ROUX, 1975). Pendant la phase de la décroissance des algues, les bactéries continuent à se multiplier rapidement (PRIEUR et LE ROUX, 1975 ; BIANCHI *et al.*, 1979).

### Production et conservation des rotifères axéniques.

Les rotifères axéniques montrent une survie de 2-3 jours quand ils sont transférés, après l'éclosion, dans un milieu stérile saumâtre et sans éléments nutritifs. Dans ce milieu, l'addition du sérum de veau a pu prolonger leur survie de 7 à 8 jours, mais les individus n'ont pas atteint leur maturité. L'utilisation de l'aliment inerte (PM1 irradié) a été efficace. Les individus montrent un bon développement et une bonne reproduction (HIRAYAMA et NAKAMURA, 1976).

Plusieurs expériences montrent que la concentration de l'aliment est un facteur important pour l'évolution du développement (HIRAYAMA *et al.*, 1979). Lorsque l'aliment est broyé son efficacité augmente car les rotifères se nourrissent par filtration avec des particules inférieures à 30 µm (DROOP et SCOTT, 1978).

Dans tous les cas, la croissance et la reproduction ont été meilleures en utilisant des algues vivantes axéniques (KITAJIMA *et al.*, 1979 ; HIRAYAMA et FUNAMOTO, 1983). Dans un ballon de 2 litres, la densité des rotifères était 50-60 ind./ml, valeur qui dépend directement du rythme de renouvellement du milieu. Cette densité a diminué considérablement quand une poussée de ciliés a été observé (REGUERRA, 1984).



C.i. : Cmp 40 $\mu$ g/ml ; Fur 30 $\mu$ g/ml ; Kan 10 $\mu$ g/ml ; Pen-G 10 UI/ml ; Str 10 $\mu$ g/ml	Durée d'incubation	C.i. $\times$ 1	C.i. $\times$ 1,5	C.i. $\times$ 2
		1 jour	+	+
	6 jours	+	+	-

TABL. 4. — Action des antibiotiques sur les bactéries associées aux algues : + présence des bactéries viables, - absence des bactéries viables, C.i. concentration initiale.

Influence of antibiotics on the bacteria associated with the algae : + presence of bacteria. - absence of bacteria, C.i. initial concentration.

FIG. 2. — Croissance des algues axéniques (1,2), des algues réassociées aux bactéries (3,4) et des algues axéniques incubées dans un extrait de culture d'algues (5,6) (Concentration du milieu nutritif : 1,5 ml/l).

Growth of axenic algae (1,2), algae reassociated with bacteria (3,4) and axenic algae incubated in the extract of a culture of algae (5,6) (concentration of nutritive elements : 1,5 ml/l).

FIG. 3. — Croissance des algues axéniques (3) et des algues réassociées aux bactéries (6) (concentration du milieu nutritif : 0,8 ml/l).

Growth of algae : Bacteria-free culture (3) and algae reassociated with bacteria (6) (concentration of nutritive elements : 0,8 ml/l).

FIG. 4. — Comparaison du rythme de la croissance pour deux concentrations de milieu nutritif. De 0 à 12 jours 0,8 ml et du 12<sup>e</sup> à la fin 1,8 ml/l. Algues axéniques (1 et 2) et non axéniques (4 et 5) (la flèche indique l'addition de milieu nutritif).

Comparison of the growth of algae for two concentrations of nutritive elements. From 0 to 12 days 0,8 ml and after 12<sup>e</sup> to the end 1,8 ml/l. Bacteria-free cultures (1 and 2) and associated with bacteria (4 and 5) (the arrow indicates the addition of nutrients).

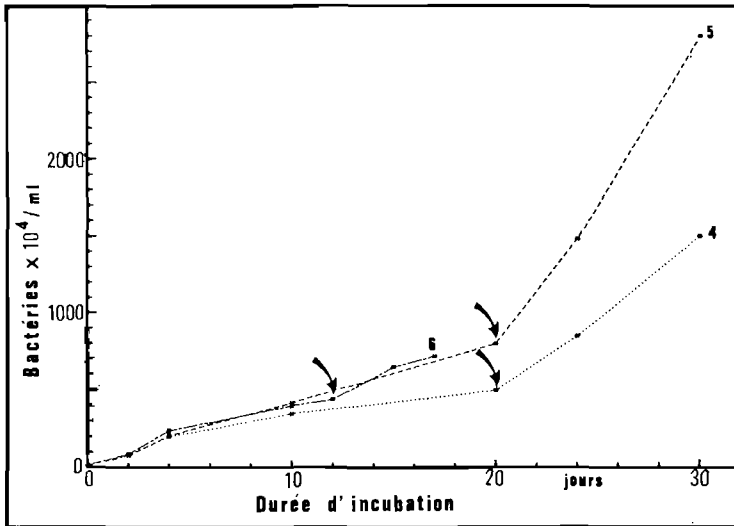


FIG. 5. — Croissance des bactéries dans les cultures d'algues (cultures 4, 5 et 6 de la deuxième expérience) (les flèches indiquent la densité maximale des algues).

Growth of bacteria in the cultures of algae (cultures 4, 5 and 6 of the second experience) (the maximum density of algae is indicated by the arrows).

## Discussion.

Les méthodes les plus efficaces pour obtenir des organismes planctoniques axéniques (sans forme de résistance), ou tout au moins sans bactéries, sont celles qui utilisent des associations d'antibiotiques. L'étude de la sensibilité des bactéries présentes dans le milieu d'élevage (par antibiogramme) permet d'utiliser de faibles doses lorsque la microflore bactérienne n'est pas associée intimement à l'hôte. Ainsi, les œufs parthénogénétiques de *Brachionus plicatilis* se prêtent bien à une décontamination (NATHAN et LADERMAN, 1959 ; DROOP et SCOTT, 1978), mais le choix arbitraire des antibiotiques, dans la littérature, imposait l'augmentation des concentrations.

Les rotifères adultes et les algues unicellulaires sont beaucoup plus difficiles à décontaminer. La microflore bactérienne doit être intimement associée à l'hôte. McFEETERS *et al.*, 1978, réfèrent la présence des bactéries sous une membrane à la surface des algues. C'est sans doute la raison pour laquelle il est extrêmement difficile d'obtenir des algues microscopiques axéniques par repiquage, après isolement sur milieu gélosé (ZOBELL et LONG, 1937). Pour atteindre ces bactéries, des concentrations élevées ont dû être utilisées pour un temps relativement long. Une telle utilisation révèle la toxicité de certains antibiotiques.

L'inconvénient d'un traitement aux antibiotiques est la difficulté de savoir quand les cellules sont affectées. Il est arrivé d'observer des algues vivantes dans les cultures traitées, mais par suite à un repiquage elles n'ont pas repoussé. La raison la plus probable est que le traitement a affecté leur capacité de reproduction (UKELES, 1975), mais la quantité d'algues inoculées au cours du repiquage est un facteur non négligeable pour le redémarrage des cultures (UKELES et BISHOP, 1976). La diminution de la variabilité des rotifères adultes traités avec des fortes doses peut être expliquée soit par l'action directe des antibiotiques soit par la rapide disparition des algues.

Les antiseptiques ne semblent pas adaptés à la décontamination des organismes planctoniques. Les ammoniums quaternaires utilisés à des doses limitées pour éliminer les bactéries ont eu une action négative sur la viabilité des œufs parthénogénétiques. Des essais préliminaires avec un iodophore (Betadine) ont donné des résultats identiques. La réalisation des cultures axéniques prouve que les éléments nutritifs apportés par les bactéries ne sont pas indispensables pour la survie de ces organismes. Par contre, les différences observées avec les aliments utilisés montrent que certaines substances sont nécessaires pour le développement des cultures (HIRAYAMA et FUNAMOTO, 1983).

Cependant, l'étude de la qualité nutritionnelle des organismes axéniques et holoxéniques (avec leur microflore naturelle) s'impose pour évaluer l'impact des bactéries sur la survie de jeunes stades de larves des poissons.

L'essai de conservation des souches à une température de  $4 \pm 1^\circ \text{C}$  dans l'obscurité a donné des résultats très intéressants (EUTENEUER *et al.*, 1983). Les œufs incubés dans l'eau saumâtre sans éléments nutritifs arrivent à l'éclosion et les individus montrent une survie de 8-9 jours. Avec l'addition de l'aliment inerte, les souches ont été conservées pendant trois mois sans autres interventions. A cette température les algues résistent bien (UKELES et BISHOP, 1976), l'activité et la consommation des individus sont réduites (SCOTT et BAYNES, 1978) et la dégradation de l'aliment est retardée, ce qui permet de conserver les vitamines et les éléments indispensables pour la survie et la croissance des rotifères.

REMERCIEMENTS

La présente étude a été réalisée dans le laboratoire du Service vétérinaire (L.N.P.A.A.) du C.O.B. La participation et les conseils de J.-L. NICOLAS ont permis la mise au point des différentes techniques.

BIBLIOGRAPHIE

- BALDINGER (I.), 1979. — Sand-liquid method for purification of cultures, from contaminants. — *Phycologia*, 18 : 165-166.
- BIANCHI (A.), LELONG (P.) et MARTIN (Y.-P.), 1979. — Dynamique des populations planctoniques et bactériennes au cours d'une production expérimentale de phytoplancton marin naturel. I. But de l'étude : variations quantitatives. — *Vie Marine*, 1 : 1-6.
- DROOP (M.R.), 1967. — A procedure for routine purification of algal cultures in antibiotics. — *British phycol. Bull.*, 3 : 295-297.
- DROOP (M.R.) et SCOTT (J.M.), 1978. — Steady state energetics of a planktonic herbivore. — *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 58 : 749-772.
- EUTENEUER (S.), LUBZENS (E.), FISHLER (R.), 1983. — A preliminary report on cold preservation of the rotifer *Brachionus plicatilis*. — *I.C.E.S. C.M. 1983/F* : 12.
- FONG (W.) et MANN (K.H.), 1980. — Role of gut flora in the transfer of amino acids through a marine food chain. — *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37 : 88-96.
- HERWIG (N.), 1979. — Handbook of drugs and chemicals used in the treatment of fish diseases. — Springfield, Illinois : Charles C. Thomas Publisher.
- HIRAYAMA (K.) et NAKAMURA (K.), 1976. — Fundamental studies on physiologie of rotifer for its mass culture. V. Dry chlorella powder as a food for rotifers. — *Aquaculture*, 8 : 301-307.
- HIRAYAMA (K.), TAGAKI (K.), KIMURA (H.), 1979. — Nutritional effect of eight species of marine phytoplankton on population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. — *Bull. jap. Soc. sci. Fish.*, 45 (1) : 11-16.
- HIRAYAMA (K.) et FUNAMOTO (H.), 1983. — Supplementary effect of several nutrients on nutritive deficiency of Baker's yeast for population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. — *Bull. jap. Soc. sci. Fish.*, 49 (4) : 505-510.
- HUNTER (E.O.) et McVEIGH (I.), 1961. — The effects of selected Antibiotics on pure cultures of algae. — *Am. J. Bot.*, 48 (2) : 179-185.
- KITAJIMA (C.), FUJITA (S.), OHWA (F.), YONE (Y), WATANABE (T.), 1979. — Improvement of dietary value for Red Sea Bream larvae of rotifers *Brachionus plicatilis* cultured with Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. — *Bull. jap. Soc. sci. Fish.*, 45 (4) : 469-471.
- LUQUET (P.), 1971. — Efficacité des protéines en relation avec leur taux d'incorporation dans l'alimentation de la truite arc-en-ciel. — *Ann. Hydrobiol.*, 2 (2) : 175-186.
- McFEETERS (G.A.), STUART (S.A.) et OLSON (S.B.), 1978. — Interactions of algae and heterotrophic bacteria in an oligotrophic stream. — Berlin : Springer Verlag : 57-61.
- NATHAN (A.H.) et LADERMAN (D.A.), 1959. — Rotifers as biological tools. — *Ann. New York Acad. Sci.*, 77 (2) : 96-101.
- PRIEUR (D) et LE ROUX (S.), 1975. — The comperative growth of some algal populations and their associated bacteria in laboratory cultures. — 10th European Marine Biology Symposium, Ostend Belgium, Vol. 1 : 345-355.
- REGUERA (B.), 1984. — The effect of ciliate contamination in mass cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. — *Aquaculture*, 40 : 103-108.
- SCOTT (A.P.) et BAYNES (S.M.), 1978. — Effect of algal diet and temperature on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. — *Aquaculture*, 14 : 247-260.
- SPENCER (C.P.), 1952. — On the use of antibiotics for isolating bacteria-free cultures of marine phytoplankton organisms. — *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 16 : 97-106.
- UKELES (R.), 1975. — Cultivation of plants. — *Unicellular plants in Marine Ecology* 3 (1) : 367-466 by O. Kinne ed. — London : John Wiley & Sons.
- UKELES (R.) et BISHOP (J.), 1976. — An unusual method for culture of unicellular marine algae. — *J. Phycol.*, 12 : 332-335.
- ZOBELL (C.E.) et LONG (H.J.), 1937. — Studies on the isolation of bacteria-free cultures of marine phytoplankton. — *J. Mar. Res.*, 4 : 328-334.



ANNEXE

Milieu de culture des algues unicellulaires

WALNE

Solution n° 1 :

Na <sub>2</sub> EDTA .....	45 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	33,6 g
NaNO <sub>3</sub> .....	100 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O .....	20 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O .....	0,36 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O .....	1,3 g (1 ml)
Traces métal .....	1 ml
Eau distillée .....	1 litre

dosage = 1 ml/l

Traces de métaux :

ZnCl <sub>2</sub> .....	2,1 g
COCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O .....	2,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O .....	0,9 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O .....	2,0 g
eau distillée .....	100 ml
HCl en quantité suffisante pour acidifier et dissoudre les sels et clarifier la solution.	

Solution n° 2 :

Vit. B <sub>1</sub> .....	200 mg
Vit. B <sub>12</sub> .....	10 ml

dosage = 0,1 ml/l

Soit pour un litre de milieu : 1 ml de solution n° 1  
0,1 ml de solution n° 2

Aliment inerte (PM1)

Spiruline .....	40 g
Levure I.F.P. ....	49 g
D-glucosamine .....	0,4 g
Chlorure de choline .....	2 g
Mélange vitaminique .....	3,6 g
Mélange minéral (LUQUET, 1971) .....	2 g
Huile de foie de Morue .....	3 g

100 g

Milieu d'Oppenheimer et Zobell

Extrait de levure Difco .....	1 g
Bacto peptone Difco .....	4 g
Phosphate ferrique .....	0,1 g
Eau distillée .....	250 ml
Eau de mer .....	750 ml

pH : 7,4-7,6

Mélange vitaminique

Vitamine A .....	750 UI	Pyridoxine .....	10 mg
Vitamine D .....	250 UI	Biotine .....	3 mg
Vitamine E .....	40 mg	Acide folique .....	4 mg
Menadione .....	4 mg	Vitamine B 12 .....	0,005 mg
Thiamine .....	5 mg	Acide ascorbique .....	500 mg
Riboflavine .....	25 mg	Meso-inositol .....	1000 mg
Pantothenate .....	50 mg	CaHPO <sub>4</sub> .....	770 mg
Acide nicotinique .....	150 mg	Total (avec excipients) .....	3000 mg