

## 52

### BACTERIES ASSOCIÉES AUX PRODUCTIONS DE *BRACHIONUS PLICATILIS*

J.L. NICOLAS et M.N. JOUBERT

IFREMER, Centre de Brest, BP 337 29273 BREST Cedex (FRANCE)

**RÉSUMÉ** - Les bactéries associées à des productions en semi-continu de *Brachionus plicatilis* donnés comme premier aliment aux larves de poissons marins ont été quantifiées sur milieu de Zobell 2216 E et identifiées. Les concentrations en bactéries sont très élevées à la fois chez les *Brachionus* (de l'ordre de  $10^{11}$  bact. ml de contenu digestif) et dans l'eau (entre  $1,6 \cdot 10^6$  et  $4,7 \cdot 10^7$  bact. ml<sup>-1</sup>). Les élevages ont été suivis pendant une période où les mortalités de *Brachionus plicatilis* survenaient régulièrement. L'installation d'un phénon de *Pseudomonas* en proportion voisine de 50 % dans la microflore dominante a persisté au cours du temps et n'a pas été influencée par le régime alimentaire. Il pourrait être à l'origine d'une répression du groupe *Vibrio/Aeromonas* habituellement trouvé en plus grande proportion. Comme autres conséquences, la microflore est faiblement diversifiée et ses potentialités réduites. Il pourrait en résulter une accumulation de métabolites toxiques ou des carences en facteurs de croissance. L'augmentation du nombre de bactéries chez les *Brachionus* au moment de mortalités peut s'expliquer par un blocage du transit de ces organismes causé par ces toxines.

**Mots clés** : bactérie, *Brachionus*, pathologie, nutrition.

**ABSTRACT** - Bacteria associated with semi-continuous culture of *Brachionus plicatilis*, which is used as the first food of marine fish larvae, were counted on Zobell 2216 E medium and identified. The numbers of bacteria were very high in both *Brachionus* (about  $10^{11}$  bact. per ml of digestive content) and in water (from  $1.6 \cdot 10^6$  to  $4.7 \cdot 10^7$  bact. per ml). The cultures were studied at driving a time when mortalities occurred frequently. The introduction of a *Pseudomonas* phenon at a proportion of about 50 % to the dominant microflora persisted in time and was little influenced by diet. It have been the cause of the repression of the *Vibrio, Aeromonas* group which was found in an unusually small proportion. It induced a lack of microflora diversity and reduced its potentialities. The activity of this microflora would not be sufficient to allow the recycling of toxic metabolites which would accumulate or induce a deficiency of growth factors. The increase in the number of bacteria present in *Brachionus* at the time of the mortalities could be explained by the toxins blocking movement of these organisms.

**Key words** : bacteria, *Brachionus*, pathology, nutrition.

### INTRODUCTION

Les larves de plusieurs poissons marins (bar, turbot, dorade,..) élevées en aquaculture reçoivent en première alimentation un rotifère, *Brachionus plicatilis*. Cette espèce zooplanctonique se reproduit rapidement par parthénogénèse et peut atteindre de hautes densités (200 à 300 individus. ml<sup>-1</sup>) dans des cuves cylindriques sous l'effet de températures élevées (18-28°C) et d'une nourriture abondante de phytoplancton et/ou de levure. Ce milieu est favorable aussi aux développements bactériens : des numérations ponctuelles donnent de l'ordre de  $10^6$  à  $10^7$  bact. ml<sup>-1</sup> dans l'eau sur milieu gélosé. Dans le milieu naturel avec des quantités de bactéries de  $10^5$  à  $10^6$  cell. ml<sup>-1</sup> dans l'eau de mer en comptage direct, Sorokin (1970) et Seki (1969) ont montré que celles-ci pouvaient fournir

une part importante (50 % et plus) de l'aliment des filtreurs zooplanctoniques de petites proies comme les rotifères. Plus récemment, Yasuda (1980) a réussi à nourrir des *Brachionus plicatilis* exclusivement à partir de cultures bactériennes. Cependant mise à part cette étude, il n'existe pas à notre connaissance d'autres données sur les relations trophiques entre bactéries et *Brachionus plicatilis*, ni même sur les populations bactériennes se développant dans les cuves de productions. Pourtant la variabilité des résultats obtenus en élevage larvaire de poissons marins pourrait trouver une explication dans les changements de la microflore bactérienne qui induirait soit une toxicité soit des carences.

Ainsi une certaine coïncidence est apparue au Centre de Brest (IFREMER) entre les mortalités de *Brachionus plicatilis* et des mauvais résultats en élevage larvaire du turbot. L'effet préventif du chloramphénicol sur cette pathologie des *Brachionus* indique qu'elle pourrait être d'origine bactérienne.

Dans cette étude préliminaire, les populations bactériennes de productions de *Brachionus plicatilis* ont été analysées pendant une période où les mortalités étaient courantes.

## **MATERIEL ET METHODES**

### ***Production de rotifères***

Deux productions de *Brachionus plicatilis* en cuve de 150 l ont été suivies pendant deux semaines. Au départ un pool de *Brachionus* a été réparti par moitié dans chaque cuve. Elles ont été entretenues suivant la méthode de Person-Le Ruyet (1975). 35 l (1/4 du volume) sont prélevés chaque jour. Pour l'une des productions (cuve G) ils sont remplacés par 15 l de culture d'une algue unicellulaire (*Isochrysis affinis salbana*) à la concentration de  $2 \cdot 10^7$  cell. ml<sup>-1</sup> en moyenne et de l'eau de mer filtrée à 1  $\mu$ m. Un complément de nourriture est apporté sous forme de levure fraîche de boulangerie (12 g). Pour l'autre production (cuve F), le renouvellement est assuré par de l'eau de mer filtrée à 1  $\mu$ m. L'aliment distribué est constitué de 12 g de levure et de 12 g d'aliment composé (levure 40 %, spiruline 49 %, prémélanges vitaminique (0,90 %) et minéral (2 %), choline 2 %, huile de foie de morue 4 %). La quantité de matière sèche apportée dans les deux cuves était équivalente.

Deux autres productions de rotifères ont été analysées ponctuellement au moment de mortalités un mois et demi après les deux premières dont elles étaient issues. L'une (cuve A) recevait le régime d'algue-levure, l'autre le régime de levure-aliment composé (cuve B).

### ***Facteurs physico-chimiques***

La température et la salinité ont été maintenues respectivement à 23°C et à 35‰. L'oxygène dissous et le pH ont été mesurés chaque jour. Les composés azotés NH<sub>3,4</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ont été dosés tous les deux jours.

Les résultats sont exprimés en ppm d'azote de chaque molécule. L'ammoniac non ionisé NH<sub>3</sub> se calcule en fonction du taux de NH<sub>3,4</sub>, du pH, de la température et de la salinité.

### ***Bactériologie***

Tous les deux jours, 20 ml par cuve ont été prélevés et passés à travers un filet à plancton de maille 63  $\mu$ m pour séparer les *Brachionus* de l'eau. Ceux-ci ont été rincés abondamment par de l'eau de mer stérile. Remis en suspension, ils ont été comptés puis broyés. Après une série de dilution au 1/10<sup>e</sup>, l'ensemencement a été fait sur milieu TCBS salé (23,5 g/l de NaCl) sur milieu de Zobell 2216E et sur un milieu chimiquement défini, milieu D (Y. Martin, 1980) de base eau de mer artificielle de Lyman et Fleming (1940) avec les

composés suivants : citrate, fumarate, saccharose, glycérol, succinate, chacun à la concentration de 0,5 g. l. 1 g/l de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , 1 g/l de caséine hydrolysée sans vitamine (Merck), un mélange de vitamines et 15 g/l de gélose. L'eau de mer a étéensemencée sur ces mêmes milieux de culture.

20 à 24 bactéries ont été prélevées au hasard sur milieu de Zobell à J0, J6 et J12 sauf pour un prélèvement (J12 eau de la cuve F) où elles l'ont été sur milieu D, le milieu de Zobell étant inexploitable. Les souches ont été soumises après purification à 33 tests morphologiques, écologiques (croissance à 4°C et à 37°C, dans 0 % NaCl et 7 % NaCl), biochimiques (catalase, oxydase, fermentation sur milieu Hugh et Leifson salé (18 g NaCl/l), galactosidase, uréase, gélatinase, tweenestérase, amylase, dnase, caséinase, acidification du glucose et du saccharose) et nutritionnels (arabinose, glucose, saccharose, acétate, butyrate, succinate, glycérol, manitol, sorbitol, alanine, glycine, tryptophane, glutamate). Les tests nutritionnels ont été effectués sur plaque de microtitration en milieu liquide.

Un programme de taxonomie numérique a classé ces souches par prélèvement sur 27 tests (sans le gram, la catalase, oxydase, caséinase et croissance à 4°C et à 37°C). Les indices de régularité fonctionnels de Troussellier et Baleux (1982) ont été calculés pour évaluer la diversité des peuplements bactériens.

## RESULTATS

Les concentrations de *Brachionus* se sont maintenues à un niveau élevé (250 à 350 individus.  $\text{ml}^{-1}$ ) dans les deux cuves ce qui représente une production journalière de  $10^6$  *Brachionus* pour 150 l.

Dans les cuves A et B, les nombres de *Brachionus* étaient respectivement de 180 ind. $\text{ml}^{-1}$  et 18 ind. $\text{ml}^{-1}$  au moment du prélèvement mais la mortalité était totale le lendemain.

### *Les facteurs physico-chimiques*

La quantité d'oxygène dissous décroît les deux premiers jours à 3 ppm soit 50 % de saturation pour se stabiliser ensuite autour de ce niveau.

Les taux de  $\text{N-NH}_{3,4}$  augmentent sensiblement dans les deux productions pour atteindre 10 ppm (cuve G) et 12 ppm (cuve F) (fig. 1).

Dans l'eau de l'élevage F, ces taux augmentent rapidement le première semaine pour atteindre un plateau autour de 10 ppm. L'ammoniac non ionisé ( $\text{N-NH}_3$ ) a un pic à 0,25 ppm le 6ème jour correspondant à un pH plus élevé (7,75). Dans l'eau de l'élevage G, la courbe des taux d'ammoniac total ( $\text{N-NH}_{3,4}$ ) a une pente moins forte. Elle n'a pas de point d'inflexion bien marqué et atteint 10 ppm au 13<sup>e</sup> jour.

Les nitrites et nitrates s'accumulent lentement dans l'élevage F mais restent en-dessous de 1 ppm. Des dosages dans l'aliment composé ont donné des quantités de nitrites et nitrates qui sont du même ordre que l'augmentation quotidienne. Pour l'élevage G, les apports et consommations de ces composés par les algues expliquent leurs variations qui restent dans des limites faibles ( 1 ppm).

### *Bactériologie quantitative*

Les numérations des bactéries de l'eau sur les milieux de Zobell et D sont importantes et stables de J1 à J8. Le milieu de Zobell donne dans l'ensemble les valeurs les plus élevées qui s'échelonnent de  $1,6 \cdot 10^6$  à  $4,9 \cdot 10^6$  bact.  $\text{ml}^{-1}$  (moyenne  $3,6 \cdot 10^6$ ) pour la production G et  $1,6 \cdot 10^6$  à  $9,7 \cdot 10^6$  bact.ml (moyenne  $4,9 \cdot 10^6$ ) pour la production F. A J10 et J12, une augmentation sensible d'un facteur 10 environ se produit avec  $4,9 \cdot 10^7$  bact. $\text{ml}^{-1}$  (G) et  $3,1 \cdot 10^7$  bact.  $\text{ml}^{-1}$  (F) en moyenne. Les numérations sur milieu D sont proches de celles du

milieu de Zobell de J1 à J8 mais n'augmentent pas à J10 et à J12, elles deviennent inférieures d'un facteur 10. Le milieu TCBS donne de 100 à 1 000 fois moins de colonies. Chez les *Brachionus*, les numérations sur milieu de Zobell et D sont constantes. Elles s'écartent peu autour de  $3.10^3$  bact/ind. (G) et  $4,7.10^3$  bact/ind. (F). Sur milieu TCBS, les numérations sont inférieures d'un facteur 100 au moins.

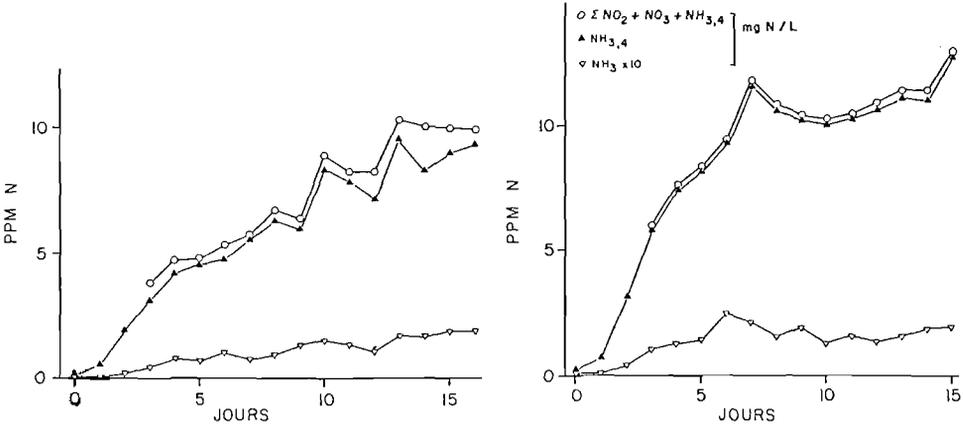


Figure 1 : Evolution des taux de  $N-NH_{3,4}$ ,  $N-NH_3$  et  $N-NO_2^-$ ,  $N-NO_3^-$ ,  $N-NH_{3,4}$  dans les élevages F (levure-PM) et G (algues-levure).

### Analyse des populations bactériennes

Mise à part une souche, toutes les bactéries recueillies sont gram négatif. Le groupe des bactéries fermentatives, représentées exclusivement par les *Vibrio/Aeromonas*, ne constitue qu'une faible proportion de la microflore en concordance avec les faibles numérations sur milieu TCBS (fig. 2). Les autres phénons peuvent être classés parmi les *Pseudomonas* bien que certains soient oxydase négative. Parmi eux, se dégagent 3 phénons importants à 91 % de similitude : les phénons 1, 2 et 3 (tab. 1). Les autres phénons ne comportent au plus que 2 ou 3 souches.

Ce phénon 1 est apporté par les *Brachionus* chez lesquels il constitue à J0 de 65 à 90 % de leur microflore (fig. 2). Il se maintient à un niveau important autour de 50 % de la microflore de l'eau comme celle des *Brachionus*, quel que soit l'aliment de J0 à J6. Un changement a lieu dans les deux élevages à J12. Dans l'eau de l'élevage F, d'autres phénons émergent probablement mais n'ont pu être recueillis, le milieu de Zobell étant inexploitable. En sous dominance sur le milieu D, on retrouve le phénon 1. Dans l'élevage G, la microflore de l'eau est dominée par le phénon 2 et celle des *Brachionus* par le phénon 3.

Les indices de régularité fonctionnelle calculés pour les prélèvements d'eau diminuent régulièrement de J0 et J12 passant de 0,70 à 0,31 (F) et de 0,52 à 0,29 (G). Chez les *Brachionus*, ces indices sont plus variables mais restent à des valeurs assez faibles (entre 0,10 et 0,58).

Dans les productions A et B, on retrouve une microflore analogue avec une prédominance de *Pseudomonas* dont le phénon 1 qui est en proportion voisine de 50 % dans l'eau comme chez les *Brachionus* (fig. 2).

	Phénon 1 Souche type	Phénon 2 Souche type	Phénon 3 Souche type
Caractère morphologique - bacille - mob.	écobacille mobilité saccadée	bacille moyen flexueux + ou -	bacille fin et régulier mobilité directionnelle
Caractères écologiques 0‰ NaCl 7‰ NaCl 4°C 37°C	— + f f	— + — —	+ + + —
Caractères biochimiques Catalase Oxydase Voie d'attaque du glucose NO <sub>3</sub> → NO <sub>2</sub> β galactosidase Uréase Gélatinase Tweenestérase Amylase Dnase Caséinase	+ + Oxydatif + — — — — — — — —	+ + Oxydatif — — — — — — — — —	+ — Oxydatif — + + + + — + +
Caractères nutritionnels Arabinose Glucose Saccharose Acétate Butyrate Succinate Glycérol Manitol Sorbitol Alanine Glycine Tryptophane Glutamate	— — — + + + + + — — + — — +	— — — — — — — — — — — — — —	— — — — — — — — — — — — — —

Tableau 1 : Caractères des principaux phénons de pseudomonades.

## DISCUSSION - CONCLUSION

Les taux de N-NH<sub>3,4</sub> sont très importants et dépassent largement le seuil de toxicité des poissons (0,5 ppm). Ils n'influent pas sur la reproduction des *Brachionus* qui ne fléchit pas. Ces taux se stabilisent dans l'élevage F. Ceci peut s'expliquer par le renouvellement partiel du milieu lorsque la quantité d'ammoniac éliminée devient équivalente à celle produite chaque jour. La nitrification ne s'est pas installée sans doute à cause du temps trop court du suivi. Ceci est conforme aux observations de Sohier (1984) dans les milieux d'aquaculture. A moins de transférer du support colonisé par les bactéries nitrifiantes, il faut de 3 semaines à 1 mois pour qu'apparaisse la nitrosation et généralement plus pour la nitratisation.

L'abondance de la flore bactérienne est à souligner. Des numérations directes auraient donné des valeurs probablement de 10 à 100 fois supérieures soit entre 10<sup>7</sup> à 10<sup>9</sup> cell.ml<sup>-1</sup> dans l'eau. Chez les *Brachionus*, les concentrations bactériennes dans le contenu digestif pourraient avoisiner 10<sup>12</sup> ou 10<sup>13</sup> cell.ml<sup>-1</sup> en estimant à 5 % le volume du contenu digestif par rapport au volume total de cet organisme. Seki (1969) évaluait quant à lui avec ce même rapport à 10<sup>11</sup> cell.ml<sup>-1</sup> de contenu digestif du zooplancton dans une eau beaucoup moins chargée en bactéries (10<sup>5</sup> à 10<sup>6</sup> cell.ml<sup>-1</sup> en comptage direct).

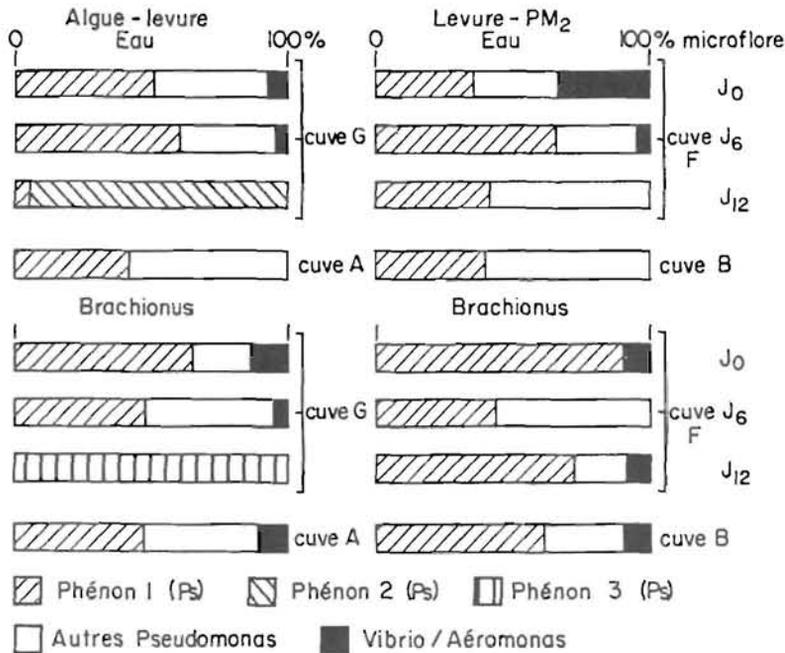


Figure 2 : Composition de la microflore bactérienne de l'eau et des *Brachionus* des élevages G et F en production normale et dans les élevages A et B lors des mortalités de *Brachionus*.

Cette masse de bactéries dans le contenu digestif des *Brachionus* est-elle digérée ? Le phénon 1, apporté par les *Brachionus* au départ, se maintient à un niveau élevé. La digestion des cellules de ce taxon, si elle existe, doit être très partielle puisqu'il persiste dans ces organismes au cours du temps. Il est plus vraisemblable qu'il se multiplie dans les *Brachionus* et peut être sur les pelotes fécales et ensemece l'eau à partir de ces foyers. La différence nette dans l'élevage G entre la microflore de l'eau et celle des *Brachionus* indique qu'il y a soit filtration sélective sans absorption du phénon 2 soit digestion du phénon 2 et multiplication du phénon 3. L'augmentation du nombre de bactéries dans l'eau peut masquer la présence du phénon 3 dans celle-ci. De toute façon, l'apport nutritif direct des bactéries par leur digestion ne doit pas être le fait de toutes les espèces bactériennes se développant dans les élevages. Yasuda (1980) n'a pu trouver que 2 bactéries sur 200 qui pouvaient, à elles seules, maintenir la production de *Brachionus* en étant probablement digérées.

Le groupe *Vibrio/Aeromonas* ne représente qu'une petite fraction de la microflore alors que Yasuda (1980) avait identifié autour de 50% de *Vibrio* dans l'eau. Nous-mêmes, dans d'autres élevages, nous avons trouvé une plus grande représentation de ce groupe. Le maintien dans le temps du phénon 1 quel que soit l'aliment est remarquable. La fixité de ce phénon et l'abondance des bactéries rapprochent plus ce milieu d'un contenu intestinal d'homéotherme que d'un biotope aquatique. Comme pour la microflore intestinale, (Raibaud et Ducluzeau, 1979), les antagonismes entre bactéries et l'interaction hôte-bactéries semblent avoir un rôle prépondérant pour déterminer la composition de la microflore. L'influence de l'aliment, important chez les homéothermes, est peut-être atténuée ici par la levure présente dans les deux régimes.

Ce phénon 1 diminue la diversité des populations bactériennes et même, semble empêcher la multiplication des bactéries actives comme les *Vibrio*. De ceci, pourrait résulter une accumulation de métaboliques toxiques ou bien entraîner une absence de synthèse par la microflore bactérienne de certains facteurs de croissance. La très nette augmentation du nombre de bactéries chez les *Brachionus* dans les élevages A et B au moment de mortalités peut être interprétée comme le résultat d'un blocage du transit digestif induit par des toxines.

---

DUCLUZEAU R., RAIBAUD P., 1979. Ecologie microbienne du tube digestif. INRA et MASSON (ed), Paris 95 p.

LYMAN J., FLEMING R., 1940. Composition of sea water. *J. Mar. Res.*, 3 : 134-146.

MARTIN Y., 1980. Communautés bactériennes hétérotrophes associées à des cultures continues de phytoplancton marin naturel. *Annales de la Fondation Ricard, hors série n° 1*, 85 p.

PERSON-LE RUYET J., 1975. Techniques d'élevage de masse d'un rotifère (*Brachionus plicatilis*) et d'un crustacé branchiopode (*Artemia salina*) 10th Eur. Symp. Mar. Biol. Ostend Sept. 1975, 1 : 331-343.

SEKI H., KENNEDY O.P., 1969. Marine bacteria and others heterotrophs as food for zooplankton in the strait of Georgia during the winter. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 26 : 3165-3173.

SOHIER L., 1983. Participation de communautés bactériennes autotrophes et hétérotrophes à l'évolution de la nitrification dans le système clos d'aquaculture. *Thèse de 3<sup>e</sup> cycle Microbiol. Fac. Pharm.* Marseille, 120 p.

SOROKIN Y.U., PETIPA T.S., PAVLOVA Y.V., 1970. Quantitative estimate of marine bacterioplankton as a source of food. *Oceanology* 10 (2) : 253-260.

TROUSSELIER M., BALEUX B., 1982. Structure et peuplements bactériens, approche méthodologique et premiers résultats en milieux lagunaires. 2<sup>e</sup> colloque de Microbiol. marine, Public. CNEXO (Act. Colloq.), 13 : 71-84.

YASUDA K. et TAGA M., 1980. Culture of *Brachionus plicatilis* Müller using bacteria as food. *Bull. Jap. Soc. Sc. Fish.* 46 (8) : 933-939.