

EVOLUTION A COURT TERME DES EFFECTIFS  
ET DE L'ACTIVITE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES  
DANS DES ECOSYSTEMES D'AQUACULTURE

Armand J. BIANCHI et Micheline A. BIANCHI

Ecologie et Biochimie microbienne du Milieu Marin.

CNRS E.R.223 . Université de Provence .

3, place Victor Hugo . 13331 Marseille.

SUMMARY

SHORT-TERM VARIATION OF BACTERIAL COMMUNITIES CONCENTRATION AND ACTIVITY IN AQUACULTURE ECOSYSTEMS.

Two kinds of short-term experiments were carried out on sea-water bacterial communities of shrimp aquaculture in Polynesia at the Centre Océanologique du Pacifique (Tahiti).

A 12 m<sup>3</sup> sea-water tank was considered. The total number (AOC) and heterotrophic activity of bacteria were studied during a 48 hours experiment with a 2 hours sampling time. The total bacterial community was about 10<sup>7</sup> bacteria, and nitrifying bacteria were about 10<sup>4</sup> bacteria ml<sup>-1</sup> and could showed doubling time of 7 hours.

Several nitrogen sources were added in five liter flasks. With N-NH<sub>4</sub> enrichment no great changes in activity and number could be seen. With organic nitrogen the number of bacteria increased 3 times in less than 4 hours and stayed high even after 22 hours. During the same time activity tested by <sup>14</sup>C amino acids increased and stayed high too.

## INTRODUCTION

Une mission pluridisciplinaire a été effectuée en Polynésie, dans le but de définir le comportement des différents paramètres entrant en jeu dans l'élevage des crevettes pénié-dés du Centre Océanologique du Pacifique (Tahiti).

Dans ce type d'élevage en circuit clos ou faiblement renouvelé l'intervention des différents constituants de la communauté bactérienne est primordiale dans les phénomènes intriqués de la minéralisation des matières organiques provenant à la fois de la nourriture excédentaire et des fèces des animaux, de la nitrification de l'ammonium produit par les bactéries et/ou les animaux en élevage, associés aux processus de production primaire et paraprimaire.

Il était donc intéressant de tenter de mettre en évidence la réaction des différents composants de la communauté bactérienne à des stimuli analogues à ceux rencontrés dans les eaux d'élevage. Ainsi, divers enrichissements par une source d'azote soit minéral,  $\text{NH}_4$  et  $\text{NO}_2$ , correspondant aux deux stades de la nitrification, soit organique, simulant les apports provenant de l'excès de nourriture et des rejets des fèces, ont été réalisés. Ces expérimentations ont été effectuées dans des écosystèmes expérimentaux, bassins d'élevage ou flacons, où le processus de nitrification était en cours d'installation ou déjà effectif.

Les conditions climatiques et la forte concentration de ces eaux en matière organique favorisent une réponse bactérienne extrêmement rapide, ce qui a permis la réalisation d'expérimentations de courte durée, mais nécessite un rythme de prélèvement très resserré, de l'ordre de une à deux heures.

## MATERIEL ET METHODES

### 1. Expérimentation en bassin de 12 m<sup>3</sup>.

Ce cycle d'étude a été réalisé dans un bac expérimental contenant 12 m<sup>3</sup> d'eau. Ce bac rempli de l'eau du lagon additionnée de 5% de l'eau d'un bassin dans lequel la nitrification était effective, reçoit 2 mg l<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub> sous forme d'acétate et 500 grammes de tourteau de coco destiné à servir de support à la microflore nitrifiante. Ce bac expérimental est dépourvu d'animaux en élevage. Un bullage intensif permettait de maintenir le taux d'oxygène dissous à saturation. Le premier jour de l'expérimentation le taux de N-NO<sub>2</sub> était nul. Au sixième jour de l'expérience 5 mg l<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub> avaient été rajoutés. Au moment de l'étude, effectuée entre le 9ème et le 11ème jour après le remplissage, la concentration en N-NH<sub>4</sub> était nulle tandis que la concentration en N-NO<sub>2</sub> était de 4,3 mg l<sup>-1</sup>. Ces valeurs attestent l'installation de la phase de nitrosation.

Les prélèvements ont été effectués toutes les deux heures. Les paramètres étudiés sur les échantillons d'eau sont : les comptages directs en épifluorescence après coloration à l'acridine orange (Hobbie, 1977), avec numération des cellules à morphologie caractéristique (cellules pédonculées en particulier) ; le dénombrement des bactéries hétérotrophes viables sur milieu gélosé de Oppenheimer et ZoBell (1952) ; le comptage des bactéries nitrifiantes par culture en milieu liquide dont la source de carbone est le carbonate de calcium et la source d'azote le sulfate d'ammonium (Carey, 1938) selon la technique du nombre le plus probable (Mc Grady, 1918) ; l'activité autotrophe par incubation de 20 ml d'échantillon avec 500 µl d'une solution de bicarbonate à 8 µCi ml<sup>-1</sup> pendant une heure, soit à la lumière (activité photosynthétique), soit à l'obscurité (activité chimiosynthétique) ; l'activité hétérotrophe par incubation à l'obscurité de 20 ml d'échantillon additionné de 20 µl d'une solution à 1 µCi ml<sup>-1</sup> soit de glucose, soit d'un mélange d'acides aminés.

### 2. Expérimentations en flacons.

Quatre flacons de 5 litres ont reçu de l'eau d'un bassin dans laquelle la nitrification est effective. L'eau de ces ballons est soumise à une aération intense par injection d'air comprimé assurant une saturation permanente en oxygène dissous.

En dehors du flacon témoin non enrichi, les autres flacons ont été respectivement enrichis en 708 µatg l<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub> (sous forme de SO<sub>4</sub> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), 236 µatg l<sup>-1</sup> N-organique (sous forme de granulés servant de nourriture aux crevettes) et 70 µatg l<sup>-1</sup> N-NO<sub>2</sub> (sous forme de NO<sub>2</sub>Na).

Un prélèvement a été effectué toutes les heures pendant cinq heures consécutives, un dernier point a été réalisé 22 heures après le début de l'expérience.

Les méthodes utilisées sont identiques à celles précédemment citées. Les paramètres étudiés sont : la numération directe des corps bactériens, le nombre des bactéries hétérotrophes viables, l'activité hétérotrophe sur glucose et mélange d'acides aminés.

## RESULTATS

La figure 1 (A, B, C, D) montre les valeurs obtenues pour les différents paramètres considérés lors de l'expérience en bassin de 12 m<sup>3</sup>. Ce cycle d'étude, effectué en période d'installation du phénomène d'oxydation du nitrite (sa disparition au cours des 48 heures l'atteste) ne permet, à première vue, de mettre en évidence aucune rythmicité quotidienne en ce qui concerne les paramètres bactériologiques. Cependant, l'ajout de 1 mg l<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub> au début de ce cycle d'étude et l'installation de la nitrification ont pu induire des phénomènes de tendance forte masquant un éventuel rythme journalier.

Les fluctuations des effectifs en bactéries hétérotrophes viables recensés sur milieu 2216 E ne correspondent aucunement à celles de la totalité de la communauté bactérienne dénombrée au microscope (fig. 1A et 1B).

L'activité nitrifiante est forte puisque le taux de NH<sub>4</sub> est ramené en 6 heures à une valeur proche de zéro (fig. 1A). La communauté bactérienne totale quadruple en 2 heures à la suite de cet enrichissement, ce qui implique des temps de génération de une heure. Dans le même temps, le pourcentage de glucose respiré passe de 73 à 9 % de l'activité hétérotrophe totale, tandis que le pourcentage de respiration sur acides aminés passe de 41 à 1 % (fig. 1D). Ces valeurs indiquent une activité à forte dominante assimilatrice de la communauté bactérienne. En modifiant l'équilibre C/N initial, l'ajout de N-NH<sub>4</sub> a provoqué une meilleure assimilation des composés carbonés de la réserve organique disponible. Dans ces conditions, où la disponibilité en azote est supérieure à celle du carbone, les communautés bactériennes utilisent ce dernier essentiellement pour produire un accroissement de biomasse bactérienne.

Deux heures plus tard, les valeurs de pourcentage de respiration sur glucose et mélange d'acides aminés passent respectivement à 12 et 17 %. Ceci montre que le métabolisme reste orienté vers une activité assimilatrice, bien que le nombre des bactéries diminue (fig. 1A et 1D). La présence, dans ce même échantillon, de flagellés et de ciliés, suggère une réduction des effectifs bactériens dûe au broutage par ces micro-organismes.

L'activité testée sur mélange d'acides aminés est relativement stable, contrairement à l'activité sur glucose qui montre des fluctuations corrélées à l'activité primaire photosynthétique (fig. 1C et 1D).

La communauté bactérienne nitrifiante augmente d'une puissance de 10 en 24 heures et passe de 2,5.10<sup>3</sup> à 9,5.10<sup>4</sup> cellules ml<sup>-1</sup>. A ce moment là, elle représente 3 % de la communauté totale. Par ailleurs, la vitesse spécifique de croissance de ces bactéries a pu être déterminée selon la formule

$$\mu = \frac{(\log_{10} z - \log_{10} z_0) \cdot 2.303}{t - t_0}$$

soit :  $\mu = \frac{(4-2) \cdot 2.303}{48}$        $\mu = 0.10 \text{ heure}^{-1}$

et le temps de génération ou temps de doublement est de :  $g = \frac{0.693}{\mu}$        $g = 6.9 \text{ heures.}$

Les figures 2 et 3 montrent l'évolution des paramètres étudiés lors de l'expérimentation en flacons de 5 litres. Dans le flacon 1, flacon témoin (fig. 2A et 3A), seuls, le nombre de bactéries pédonculées et le taux de NH<sub>4</sub> subissent quelques variations. Il est probable que cette réaction corresponde à la consommation, par les bactéries hétérotrophes, de la matière organique présente dans l'eau avec production d'ammoniac.

Dans le flacon 2, enrichi en NH<sub>4</sub>, le nombre total de bactéries varie peu (fig. 2C). L'enrichissement en azote minéral a induit une augmentation de l'activité sur source carbonée (fig. 3C). Il faut remarquer que 22 heures après l'enrichissement le NH<sub>4</sub> n'a pas été utilisé par la microflore nitrifiante (fig. 2C). Il est probable que l'enrichissement en NH<sub>4</sub> (708 µatg l<sup>-1</sup>) a dépassé la capacité d'oxydation de la communauté présente au départ de l'expérience.

Dans le flacon 3, enrichi en matière organique, trois phases se succèdent. Dans un premier temps, la communauté bactérienne totale augmente avec, proportionnellement un pic de bactéries pédonculées (fig. 2B). Cette communauté bactérienne hydrolyse la matière organique, fournie sous forme de grosses molécules, avec production d'acides aminés et d'ammoniac.

Ainsi, un pic de  $\text{NH}_4$  apparait en 3 heures (fig. 2B). Dans un deuxième temps, la communauté bactérienne hétérotrophe poursuit son augmentation, mais, le nombre de bactéries pédonculées diminue, indiquant un changement qualitatif de cette communauté. Le  $\text{NH}_4$  n'est alors plus produit mais consommé (fig. 2B). Dans le même temps la communauté hétérotrophe montre une meilleure assimilation des acides aminés (fig. 3B). L'hydrolyse des protéines et la libération des acides aminés, effectuées sous l'action bactérienne, s'est manifestée sous forme d'un flux permanent permettant un changement de la structure (élimination des bactéries pédonculées et de l'activité de la communauté bactérienne (assimilation des acides aminés).

Enfin, au cours d'une troisième phase, le taux de  $\text{NH}_4$  ayant atteint une valeur minimale, le nombre total des bactéries diminue dans l'heure suivante. Puis une augmentation des formes pédonculées est à nouveau concomitante d'une augmentation du taux de  $\text{NH}_4$ . De même que dans le flacon enrichi en  $\text{NH}_4$ , il ne semble pas y avoir une action importante de la microflore nitrifiante. Les taux d'ammonium atteints étaient probablement trop élevés, ici aussi, pour la capacité nitrifiante de la microflore spécifique déjà en place lors de l'enrichissement.

Dans le flacon 4, l'enrichissement en  $\text{NO}_2$ , bien que quantitativement beaucoup plus faible ( $70 \mu\text{atg l}^{-1}$ ) provoque un accroissement du nombre total de bactéries en une heure, suivi du retour à la normale en deux heures (fig. 2D). Un pic de bactéries pédonculées précède un pic de  $\text{NH}_4$ . L'activité hétérotrophe mesurée sur glucose reste faible, inférieure à celle du flacon témoin. Par contre, l'activité hétérotrophe mesurée sur acides aminés est stimulée (fig. 3D) et ses variations suivent celles du nombre total de bactéries.

## DISCUSSION

Une caractéristique intéressante de ces eaux lagunaires tropicales est la rapidité d'installation des phénomènes de nitrification qui se manifestent en une quinzaine de jours, alors qu'en zone tempérée Lesel et Leffenberg (1977) citent une durée de l'ordre de 2 mois. Ces auteurs font état de l'effet inhibiteur de la partie hétérotrophe de la microflore qui ne semble pas se manifester dans les eaux d'élevage du C.O.P., riches en matières organiques supportant une microflore hétérotrophe abondante ( $10^7$  cellules  $\text{ml}^{-1}$ ).

Il convient de considérer l'effet de la température. En effet, la température optimale de la microflore nitrifiante est de  $25-35^\circ\text{C}$  (Buswell et al., 1954), les températures ambiantes relevées à Tahiti ( $25-28^\circ\text{C}$ ) ont pu accélérer le phénomène d'installation de la nitrification. Par ailleurs, les eaux étudiées sont riches en matières organiques qui, selon certains auteurs (Mével, 1979) stimulent la nitrification, en particulier lors de la présence de substrats organiques azotés, ce qui est le cas des granulés et des fèces constituant l'essentiel de la réserve organique de ces bassins d'élevage. On a pu remarquer que la réponse bactérienne nitrificatrice aux additions ponctuelles de  $\text{N-NH}_4$  est soit lente, (cas du bassin de  $12 \text{ m}^3$ ), soit imperceptible (cas des flacons). Ceci tendrait à démontrer que l'activité et le nombre des bactéries nitrifiantes sont ajustés à un taux préexistant de  $\text{NH}_4$  et ne s'adaptent que lentement à une situation nouvelle si la variation de concentration est brutale. Spotte (1970) préconise d'ailleurs l'introduction progressive d'animaux afin de réaliser et d'ajuster la nitrification de ces eaux d'élevage à la charge en animaux et donc au taux d'ammoniac qui en résulte.

Dans le bassin de  $12 \text{ m}^3$  les temps de génération sont de l'ordre de 7 heures après un enrichissement en ammoniac. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues en culture pure (8 heures) citées par Morill et Davson (1967) et Skinner et Walker (1961). Elles sont également assimilables aux plus faibles valeurs notées en milieu naturel et qui varient entre 8 et 36 heures (Skinner et Walker, 1961 ; Knowles et al., 1965).

Il faut cependant préciser que de tels temps de génération ne sont obtenus que pendant de courtes périodes, lors de la phase exponentielle de développement et pour des températures élevées ( $27^\circ\text{C}$ ).

Par ailleurs, la forte concentration en particules en suspension (fibres de tourteau de coco) a pu favoriser la prolifération de la microflore nitrifiante qui a tendance à se fixer sur des supports (Matulevich et Finstein, 1975 ; Lesel, 1979).

La microflore hétérotrophe est abondante variant entre  $2.10^7$  et  $5.10^7$  cellules  $\text{ml}^{-1}$ . Elle présente également des variations qualitatives. En effet, le pourcentage de bactéries pédonculées varie très rapidement (une heure) à la fois en fonction du taux de matière organique et du taux d'ammoniac.

L'activité hétérotrophe de cette microflore sur traceur  $^{14}\text{C}$  glucose ne présente de corrélation directe qu'avec la production primaire photosynthétique. Cette concomitance des activités hétérotrophe et autotrophe est une réponse différente de celle observée par Cahet et Jacques (1976) qui, lors d'expériences d'enrichissement d'eau de mer ont mis

en évidence un pic d'activité sur  $^{14}\text{C}$ -glucose avant le maximum de la production primaire. Au contraire, Herbland (1974) a noté, dans l'upwelling de Mauritanie, que le pic d'activité autotrophe précède le pic d'activité hétérotrophe. Ainsi, si les communautés bactériennes hétérotrophes réagissent toujours aux conditions nouvelles créées par une activation de la production primaire photosynthétique leur réponse n'est pas toujours identique.

Lors des expériences d'enrichissement en matière organique, la diminution très nette du taux de respiration traduit un métabolisme essentiellement inductif de biomasse bactérienne. La rapidité de cette réponse physiologique permet de concevoir la potentialité d'une minéralisation rapide de la matière organique.

Hollibaugh et al., (1980) font ressortir que l'oxydation des acides aminés est la source principale de régénération de l'ammoniac dans le milieu naturel. Ce phénomène est particulièrement net dans le flacon 3 enrichi en matière organique. Dans ce cas, l'activité hétérotrophe sur  $^{14}\text{C}$ -acides aminés augmente fortement après 4 heures d'expérimentation et dès la 5ème heure le taux d'ammoniac suit une courbe ascendante, confirmée 19 heures plus tard en fin d'expérimentation.

En conclusion l'étude des réactions des communautés bactériennes des eaux d'élevage à un stress précis, ici des enrichissements en différentes sources d'azote, lors d'expérimentations de courte durée et procédant de temps d'échantillonnage court, permet de mettre en évidence les réponses successives des différents composants de ces communautés bactériennes. Ainsi, la microflore hétérotrophe réagit rapidement en activité métabolique, en concentration cellulaire et en composition qualitative.

A l'opposé, la partie autotrophe (nitrifiante) présente des phases d'adaptation aux conditions nouvelles plus longues et des réactions plus progressives.

L'étude des cinétiques de réponse de ces différentes composantes de la communauté bactérienne est maintenant nécessaire pour prévoir une modélisation de leur comportement.

## RESUME

La participation bactérienne aux processus de minéralisation et de détoxification des eaux d'élevage des crevettes pénéidées du Centre Océanologique du Pacifique a été envisagée sous forme d'expériences à court terme.

Un cycle d'étude de 48 heures avec un rythme de prélèvement de 2 heures, a permis de mettre en évidence dans l'eau d'un bassin expérimental de 12 m<sup>3</sup>, des temps de génération de bactéries nitrifiantes de l'ordre de 7 heures, correspondant à un enrichissement ponctuel de 1 mg l<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub>. La nitrification de cet ammoniac nécessite 6 heures. La communauté bactérienne dans son ensemble ne présente pas de rythmicité quotidienne. L'activité hétérotrophe testée sur glucose montre une stimulation par la production primaire phototrophe.

Une expérience en flacons de 5 litres contenant l'eau d'un bassin à nitrification effective montre la sensibilité de la communauté bactérienne à l'azote organique et l'impossibilité pour la microflore nitrifiante d'oxyder des apports ponctuels massifs de NH<sub>4</sub>.

## MOTS CLES

DYNAMIQUE NUMERATION ACTIVITE COMMUNAUTES BACTERIENNES AQUICULTURE

## REMERCIEMENTS

Nous avons le plaisir de remercier Monsieur Guy Cahet (Laboratoire Arago, Banyuls sur Mer) qui a assuré le comptage des échantillons relatifs aux expériences d'activité microbiennes, ainsi que Monsieur Ivan Sivadon qui a réalisé les dénombrements au microscope.

Les résultats concernant les sels minéraux nous ont été aimablement communiqués par Paul Nival, Christiane Cellario et Gilbert Mallarat (Station Zoologique de Villefranche sur Mer) qui ont effectué les dosages à l'aide d'un auto-analyseur Technicon, qu'ils en soient remerciés.

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un contrat avec le C.N.E.X.O.

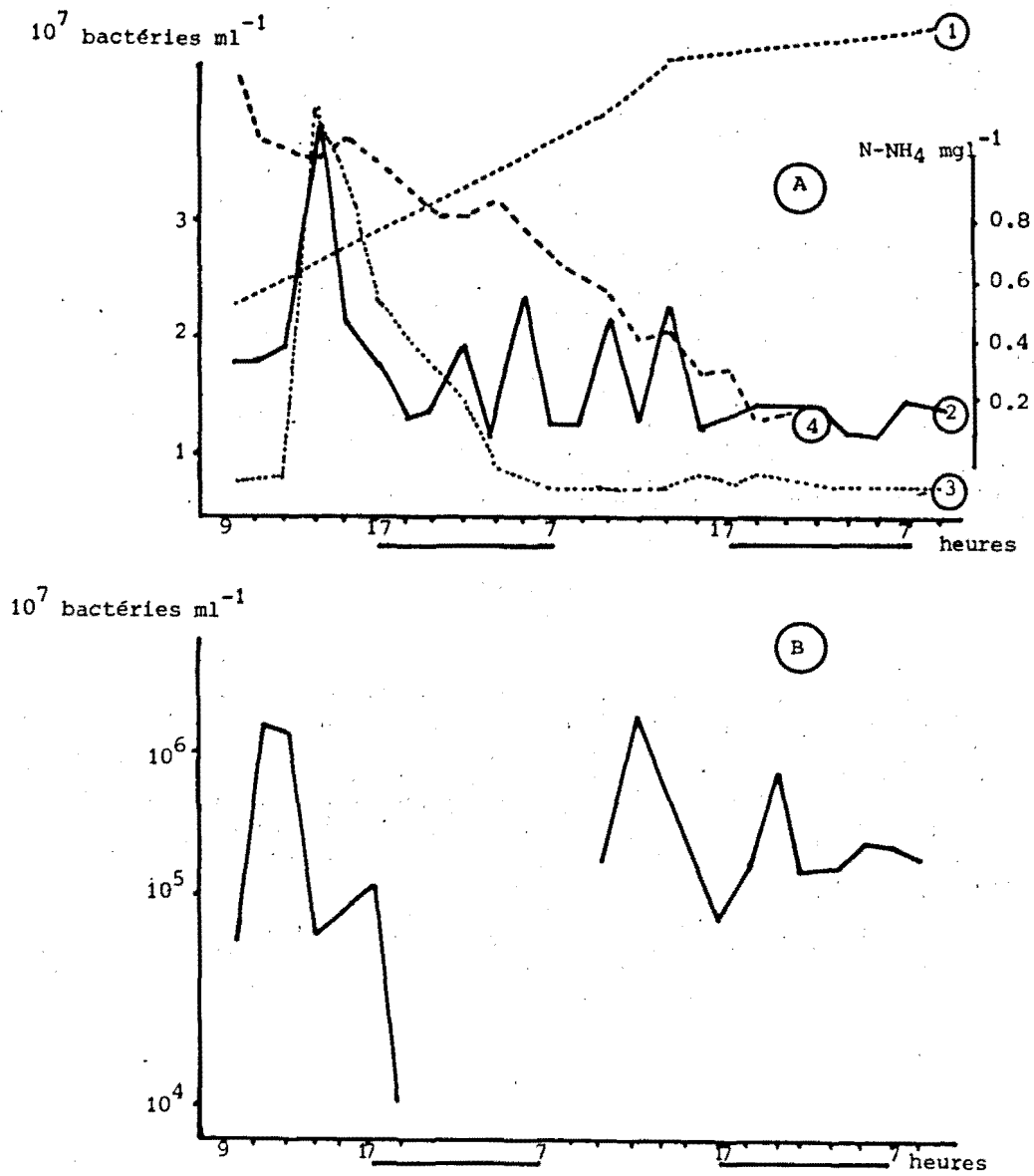


Figure 1 . Evolution des communautés bactériennes au cours d'un cycle d'étude de 48 heures.

Les barres de 17 à 7 heures indiquent les périodes nocturnes.

Fig. 1 A : — nombre total de bactéries, --- nombre de bactéries nitrosantes, ..... taux de  $\text{NH}_4$ ,  
 -- taux de  $\text{NO}_2$ .

Fig. 1 B : — nombre de bactéries hétérotrophes viables.

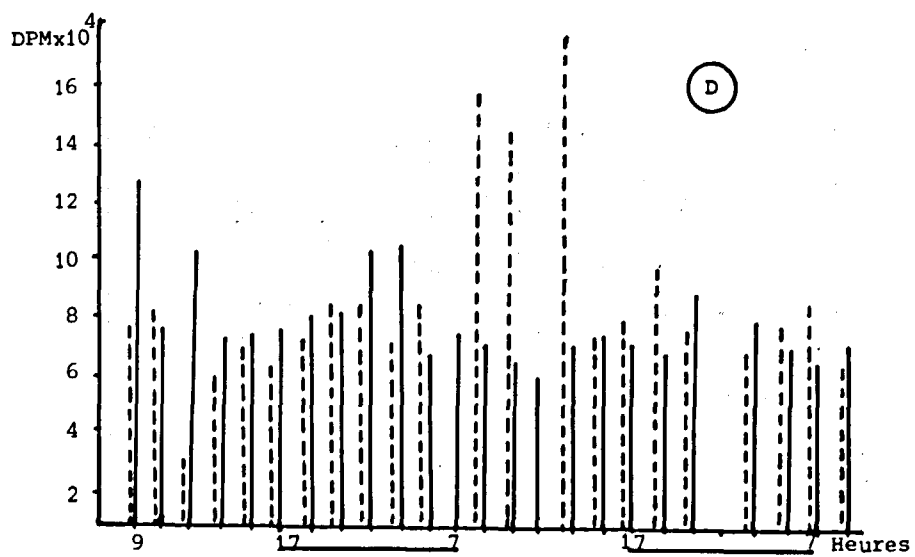
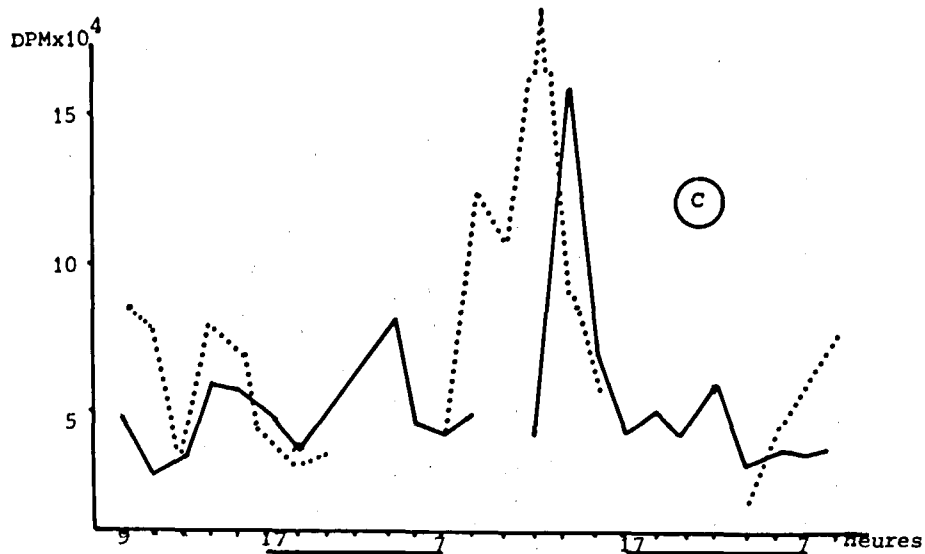


Fig. 1 C : — activité autotrophe chimiosynthétique, ..... activité autotrophe photosynthétique.  
 Fig. 1 D : — activité hétérotrophe sur  $^{14}\text{C}$  acides aminés, --- activité hétérotrophe sur  $^{14}\text{C}$  glucose.

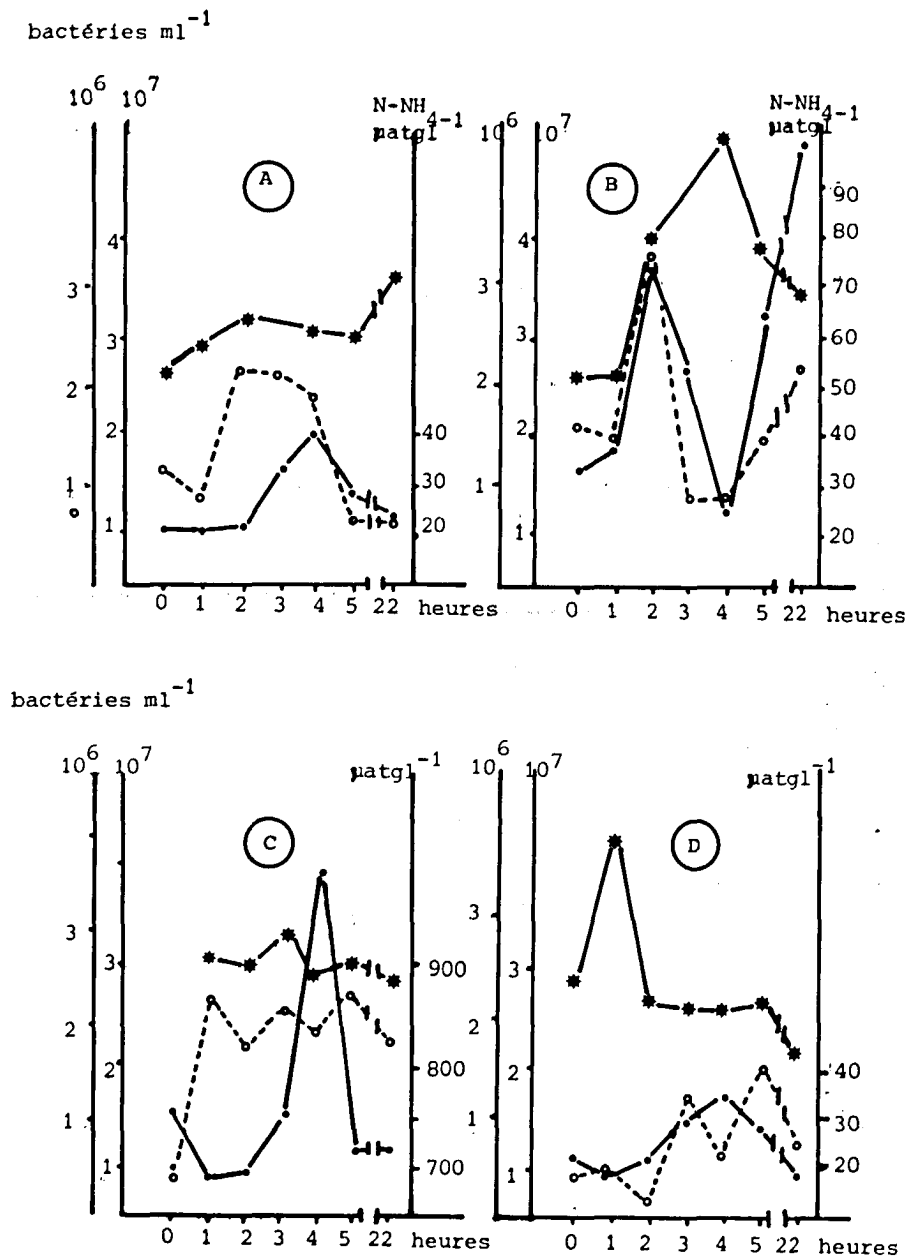


Figure 2 . Evolution des communautés bactériennes lors des expériences en flacons de 5 litres : \*—\* nombre total de bactéries, —. taux de N-NH<sub>4</sub>, °—° nombre de bactéries pédonculées.

Fig. 2 A : Flacon témoin

Fig. 2 B : Flacon enrichi en N-matière organique

Fig. 2 C : Flacon enrichi en N-NH<sub>4</sub>

Fig. 2 D : Flacon enrichi en N-NO<sub>2</sub>



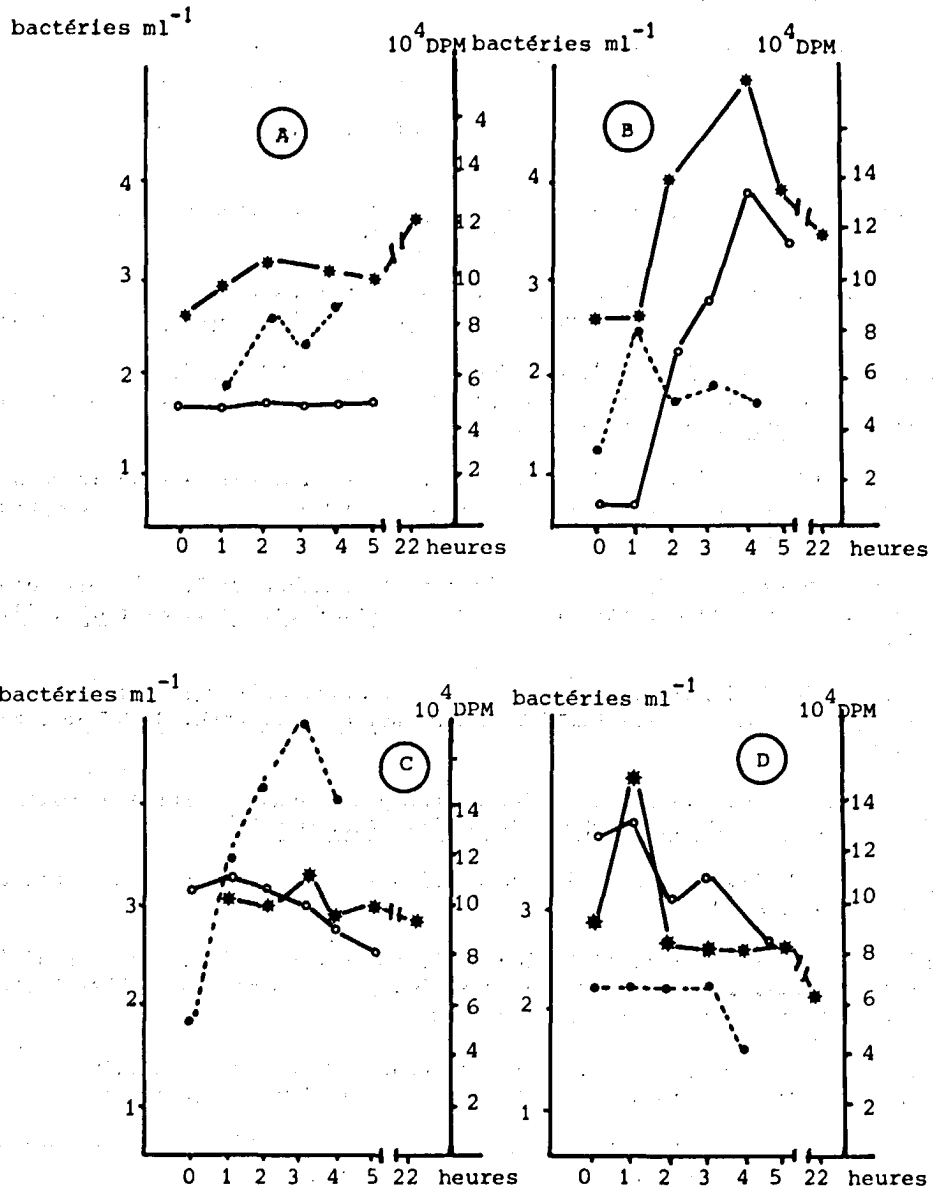


Figure 3 . Evolution des communautés bactériennes lors des expériences en flacons de 5 litres : \*—\* nombre total de bactéries, ----. activité hétérotrophe sur  $^{14}\text{C}$  glucose °—° activité hétérotrophe sur  $^{14}\text{C}$  acides aminés.

Fig. 3 A : Flacon témoin

Fig. 3 B : Flacon enrichi en N-matière organique

Fig. 3 C : Flacon enrichi en  $\text{N-NH}_4$

Fig. 3 D : Flacon enrichi en  $\text{N-NO}_2$

## BIBLIOGRAPHIE

- BUSWELL, A. M., T. SHIOTA, N. LAWRENCE and I.W. METER. 1954. Laboratory studies on the kinetics of growth of *Nitrosomonas* with relation to the nitrification phase of the B.O.D. test. Appl. Microbiol. 2, 21-25.
- CAHET, G. et G. JACQUES. 1976. Assimilation de glucose dans la zone de divergence de Méditerranée Nord-Occidentale. Int. Revue ges. Hydrobiol. 61, 5, 649-658.
- CAREY C. L. 1938. The occurrence and distribution of nitrifying bacteria in the sea. J. mar. Res. 1, 291-304.
- HERBLAND, A. 1974. Activité bactérienne dans l'upwelling mauritanien. Relations avec l'oxygène et la matière organique. Tethys, 6, 203-212.
- HOBBIE J. E., R. J. DALEY and S. JASPER. 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. Appl. and env. Microbiol. 33, 5, 1225-1228.
- HOLLIBAUGH, J. T., A. B. CARRUTHERS, J. A. FUHRMAN and F. AZAM. 1980. Cycling of organic nitrogen in marine plankton communities studied in enclosed water columns. Mar. Biol. 59, 15-21.
- KNOWLES, G., A. L. FOWNING and M. J. BARRET. 1965. Determination of kinetic constants for nitrifying bacteria in mixed cultures, with the aid of an electronic computer. J. gen. Microbiol. 38, 263-278.
- LESEL, R. et F. LEFFEMBERG. 1977. Etude de la nitrification dans les circuits d'eau recyclée. I. Oxydation des nitrites. Bull. Cent. Rech. Sci., Biarritz, 11, 4, 441-459.
- LESEL, R. 1979. Etude de la nitrification dans les circuits d'eau recyclée. II. Dynamique des microflores bactériennes. Bull. Cent. Etud. Rech. Sci. Biarritz, 12, 4, 651-680.
- MATULEWICH, V. A., and M. J. FINSTEIN. 1975. Water phase and rock surfaces as the site of nitrification. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. Abstract 30.
- MCGRADY M. H. 1918. Tables for rapid interpretation of fermentative tube results. Can. J. publ. Health 9, 201-219.
- MEVEL, G. 1979. Conditions de nitrification de la matière organique dans les sédiments marins en système clos. Applications aux élevages de pénéidés. Thèse Doctorat 3ème Cycle. Université de Bretagne Occidentale.
- MORRILL, L. G. and J. E. DAWSON. 1967. Patterns observed for the oxidation of ammonium to nitrate by soil organisms. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 31, 757-760.
- OPPENHEIMER, C. and C. E. ZOBELL. 1952. The growth and viability of sixty three specimens of marine bacteria as influenced by pressure. J. mar. Res. 11.
- SKINNER, F. A. and N. WALKER. 1961. Growth of *Nitrosomonas europaea* in batches and continuous culture. Arch. Mikrobiol. 38. 339-349.
- SPOTTE, S. H. 1970. Fish and invertebrate culture - water management in closed systems. Wiley. N.Y. 145 pp.