

EFFET DE LA QUALITE DE L'EAU SUR LA CROISSANCE LARVAIRE DE PECTEN MAXIMUS
EN ECLOSERIE : OBSERVATIONS PRELIMINAIRES

par

J.F. SAMAIN*, J.C. COCHARD*, L. CHEVOLOT*, J.Y. DANIEL*
C. JEANTHON**, J.R. LE COZ*, Y. MARTY***, J. MOAL*, D. PRIEUR**, M. SALAUN*

* IFREMER, Centre de Brest, BP 337, 29273 Brest Cedex, FRANCE

** Université de Bretagne Occidentale, U.A.CNRS 322, 29287 Brest Cedex, FRANCE

*** GERBAM, Laboratoire de Zoologie, Université de Bretagne Occidentale,
29287 Brest Cedex, FRANCE.

ABSTRACT : EFFECT OF SEA WATER QUALITY ON LARVAL GROWTH OF PECTEN MAXIMUS IN A HATCHERY :
PRELIMINARY RESULTS

A positive increase in larval growth of Pecten maximus was observed when they were cultivated in sea water from a pond, compared with those cultivated on sea water from outside. The two waters were filtered on 1 μ m CUNO filters, the other parameters, light, temperature and food (cultivated phytoplankton) were identical. Differences in larval growth were independant from season and were recorded in length, dry weight, organic matter, ash, total proteins, glycogen, lipids. Preliminary measurements of filtered sea water chemistry (aminoacids, fatty acids, organic matter, nutrients), on particulate matter (electronic microscope) or autotrophic and heterotrophic productivity were performed in December and June. Higher levels were observed on particulate matter, organic carbon, number of bacteria, flagellated cells (in the range of 1 micron), heterotrophic productivity in the water from the pond but the seasonality of these differences is to be investigated. Higher activities were recorded in amylase, laminarinase and trypsin activity of larvae cultivated on the water from the pond suggesting ingestion of the related substrates. The growth effect disappeared when water from the pond was 0.22 μ m filtered. Picoplankton and bacteria will be investigated in the future as they could be an explanation of these first results.

Key words : water quality, growth factor, P. maximus, hatcheries.

RESUME

Des différences positives de croissance sont observées quelle que soit la saison, pour des larves de Pecten maximus élevées dans l'eau d'un ancien vivier, comparativement avec l'eau qui l'alimente périodiquement. Ces eaux sont filtrées au préalable à 1 μm sur des cartouches CUNO, les élevages sont par ailleurs menés dans les mêmes conditions de lumière, de température et de nourriture (phytoplancton de culture). Cette différence est significative en termes de taille, poids sec, matière organique, cendres, protéines totales, glycogène, lipides des larves. Une série d'observations préliminaires sur la composition chimique de ces deux eaux après la filtration (acides aminés, acides gras, matière organique, sels nutritifs), sur la flore bactérienne (totale, hétérotrophes, vibrio), sur le matériel particulaire par microscopie électronique, sur la productivité autotrophe et hétérotrophe a été effectuée en décembre et en juin. Les différences observées concernent la charge particulaire, le nombre de bactéries, la présence de cellules à flagelles de l'ordre du micron et une productivité hétérotrophe qui sont supérieurs dans l'eau du vivier. Mais, le maintien de ces différences avec la saison ne peut être affirmée. Les larves possèdent des activités amylase, laminarinase et trypsine supérieures dans l'eau du vivier suggérant l'ingestion des substrats correspondants. L'amélioration de la croissance est perdue si l'eau du vivier est filtrée à 0.22 μm . La nature particulaire et hétérotrophe du facteur actif oriente la suite de l'étude sur le picoplancton et les bactéries qui pourraient expliquer ces résultats préliminaires.

Mots clés : qualité d'eau, facteur de croissance, P. maximus, écloséries.

INTRODUCTION

A plusieurs reprises les écloséries de mollusques bivalves signalent des différences de résultats dans les élevages, en termes de croissance, de développement, de métamorphose et de fixation, bien qu'en apparence de mêmes protocoles expérimentaux aient été respectés. La qualité de l'eau est alors incriminée sans pour autant que ce terme soit précisé. Un tel exemple est observé à l'éclosérie d'Argenton (Finistère) où la vitesse de croissance de larves de Pecten maximus est notablement affectée par l'origine de l'eau de mer filtrée à 1 μm , selon qu'elle est pompée en mer ouverte ou dans un ancien vivier principalement alimenté aux vives eaux. Le travail rapporté ici tente de caractériser le phénomène et d'en étudier les causalités.

MATERIEL ET METHODES :

Traitement de l'eau : l'écloserie est implantée près d'un ancien vivier à crustacés de 3 600 m³ (profondeur 2 m) qui sert de réserve d'eau. L'eau de ce vivier (eau V) est partiellement renouvelée par les hautes mers de coefficient supérieur à 60. Une station de pompage est alimentée par deux canalisations placées dans le vivier. D'une longueur d'environ 30 m, elles sont utilisées alternativement à intervalle de deux semaines afin de limiter les salissures biologiques. Une troisième adduction d'eau (50 m) permet le pompage à marée haute à l'extérieur du vivier (eau E). Ces deux eaux sont ensuite traitées de la même façon, la filtration se fait en deux étapes : une filtration sur filtre à sable, nettoyé chaque jour à contre courant, puis une filtration à 1 µm par deux cartouches filtrantes de polypropylène (AMF CUNO DPPPY) en série. Lorsqu'une filtration à .22 µm a été utilisée, la seconde cartouche 1 µm a été remplacée par une cartouche en nylon hydrophile (Zetapor .22 µm). Tous les élevages ont été réalisés en eau thermorégulée à 18°C dans une salle soumise à la lumière naturelle, complémentée d'un éclairage artificiel pendant les heures ouvrables.

Elevage des larves : les élevages larvaires ont été menés suivant des techniques adaptées de "GRUFFYDD et BEAUMONT (1970, 1972)" décrites par "BUESTEL et al. (1982)". Les larves sont élevées en bacs cylindriques à fond conique de 400 l dont l'eau est agitée par insufflation d'air à la pointe du cône. La nourriture distribuée chaque jour est composée d'un mélange de Pavlova lutheri, Isochrysis aff. galbana (T. iso), Chaetoceros calcitrans ; les concentrations finales respectives sont de 20, 20, 10 cellules par microlitre pour 12 à 13 larves par ml. La prolifération bactérienne est limitée par adjonction de chloramphénicol à raison de 8 mg/l "LE PENNEC et PRIEUR (1972)". Les bacs d'élevage sont vidangés et nettoyés au détergent trois fois par semaine. Les larves recueillies sur un tamis de 45 µ sont lavées à l'eau filtrée. A cette occasion un échantillon est prélevé pour le contrôle de la survie et de la croissance. La croissance a été évaluée par la mesure au micron de la plus grande dimension de 30 individus par bac à l'aide d'un projecteur de profil NIKON V12 équipé d'un vernier électrique. Pour l'expérience réalisée en béciers de deux litres, les mêmes techniques ont été utilisées, l'eau n'a cependant pas été agitée par bullage. Des triplicats ont été réalisés systématiquement. En fin d'expérience, un tri des larves a été effectué : les larves retenues sur un tamis de 150 µ sont en majorité au stade pédivéligère et peuvent donc être transférées en nurserie. Un rendement en larves pédivéligères est défini comme le pourcentage de larves qui ont atteint ce stade.

Conditionnement de l'eau : pour étudier l'évolution de l'eau sans les larves dans les bacs d'élevage, des bacs similaires ont été remplis par l'eau des deux provenances et ont été suivis pendant le cycle correspondant de l'élevage (48 heures entre deux changements d'eau). Un lot a été incubé sans apport, l'autre a été complémenté du milieu des cultures d'algues habituellement fournies à l'élevage. Ce milieu a été préparé par centrifugation de la culture à 3000G pendant 10 mm suivi d'une filtration sur Filtre GFC Whatman.

Analyses chimiques : la salinité a été déterminée par la méthode de "KNUDSEN (AMINOT 1983)", l'ammonium [NH_4] par la méthode de "KOROLEFF (1969)", les nitrates, selon la procédure de "TREGUER et de LE CORRE (1975)", le carbone organique total (COT) par la méthode de "MENZEL et VACARO (1964)". L'analyse de lipides a été faite en chromatographie gazeuse (GC) sur colonne capillaire "MARTY (1976)". L'analyse des acides aminés libres dissous (AALD) a été réalisée par la méthode à l'OPA selon la procédure de "MANAGAU et MADEC (1986)".

La chlorophylle "a" : a été dosée selon la méthode de "YENTSCH et MENZEL (1963)" sur le matériel particulaire recueilli par filtration sur des filtres Sartorius. 45 μm .

Bactéries : les analyses ont porté sur l'eau E et V avant et après filtration, et avant la vidange des bacs (en présence des larves et des algues). Une étude préliminaire a été effectuée en décembre et une étude plus complète du 2 au 18 juin 1986. Les eaux des bacs traitées au chloramphénicol ont été suivies pendant les 7 cycles de renouvellement. Les flores bactériennes ont été dénombrées sur les milieux ZOBELL 2216E d'"OPPENHEIMER et ZOBELL (1952)" et TCBS "KOYABACHI et al. (1963)", ainsi que par microscopie en épifluorescence selon la méthode décrite par "HOBBIE et al. (1977)". La biomasse bactérienne a été mesurée lors du premier et du dernier cycle d'élevage selon la méthode décrite par "FRY et DAVIES (1984)".

Production autotrophe et hétérotrophe : l'eau de mer des deux origines (vivier, eau extérieure), avec ou sans addition du milieu de culture des algues, a été incubée dans des flacons de 100 ml en présence de bicarbonate marqué au ^{14}C pour mesurer l'activité autotrophe, ou de thymidine tritiée pour l'activité mCi/mole) ou 20 μCi de methyl ^3H thymidine (45 Ci/mole) ont été introduits dans chaque échantillon. Pour chaque échantillon, on a réalisé un témoin formolé (0,1 % concentration finale). Un témoin incubé au noir a été réalisé dans le cas de la production autotrophe. Les flacons ont été suspendus dans les bacs cylindroconiques de 400 l d'élevage larvaire ; l'incubation a duré 4 heures. Les incubations ont été stoppées par filtration sur membranes Sartorius de 0,2 μm pour les échantillons au ^{14}C et les filtres placés dans des fioles à scintillation liquide en présence de 2 gouttes d'HCl 0,1 N à 40° C pendant une nuit. Dans le cas des incubations avec la thymidine, des aliquotes de 20 ml ont été prélevées et mélangées au même volume de TCA (10 %) avant la filtration. Le filtre est ensuite lavé 5 fois par 1 ml de TCA (5 %) "FUHRMAN and AZAM (1982)" avant d'être placé dans une fiole à scintillation.

Les filtres sont ensuite brûlés (PACKARD OXIDIZER, modèle 306) pour éliminer le quenching dû au filtre et aux particules. Deux types de mélange scintillant ont été utilisés : 5 ml de carbosorb + 15 ml de Permafluor pour le marqueur ^{14}C , et 16 ml de Monophase 40 pour le tritium. Le comptage est effectué dans un compteur à scintillation liquide, après établissement des courbes de quenching et les résultats exprimés en dpm. Le nombre de molécules de thymidine incorporées a été calculé par la formule :

$$\text{moles} = \text{dpm} \times (\text{AS})^{-1} \times 4,5 \cdot 10^{-13}$$

où AS est l'activité spécifique de la solution de thymidine en Ci/mole et $4,5 \cdot 10^{-13}$ est le nombre des Curies par dpm. Les valeurs des témoins formolés ont été soustraites.

La vitesse d'assimilation du bicarbonate marqué a été calculée par la formule

$$V = \frac{\text{dpm} (\text{Sn} + \text{A})}{\text{C} \cdot \mu \cdot t}$$

où V est la vitesse d'assimilation en mg carbone/l/h. ; Sn, la concentration naturelle de bicarbonate en mg C/l du substrat non marqué de l'échantillon ; A, la concentration en mg C/l du substrat marqué ; C, le nombre de dpm fournies par $1\mu\text{Ci}$; μ , la quantité de μCi ajoutée par échantillon ; t, le temps d'incubation en heures.

Microscopie électronique : un échantillon de 250 ml est prélevé de chaque bassin dans un flacon (soigneusement nettoyé au mélange sulfochromique) et auquel est rajoutée une solution de "glutaraldéhyde - formol" pour la fixation (1 % final). L'échantillon ainsi préparé est conservé au réfrigérateur à $+4^\circ\text{C}$. Chacun des échantillons (5 à 10 ml) est filtré sur Nucléopore ($0,4 \mu$ ou $0,2 \mu$) de 13 mm, à l'aide d'une seringue et un "contre-filtre" est déposé sur le premier afin d'éviter toute perte au cours des manipulations suivantes. Chaque préparation subit ensuite la dessiccation : plusieurs bains successifs d'alcool à 50-75-85 et 100 % d'une durée d'une 1/2 heure chacun (éthanol absolu), avant de passer au point critique (enceinte à 40°C et à 110 b). Lorsque le point critique est terminé, on effectue la métallisation sur le filtre, qui est alors prêt à l'observation au microscope électronique à balayage.

Biochimie de la croissance larvaire : outre les mensurations des larves, des prélèvements de 50 000 larves ont été réalisés pour effectuer d'autres mesures pondérales ou biochimiques de la croissance. Les larves sont filtrées sur filtres Sartorius. $45 \mu\text{m}$ après avoir été au préalable comptées puis concentrées sur tamis. Elles sont récupérées puis transférées sans le filtre dans un broyeur de Potter ou elles sont broyées dans 2ml d'eau distillée. L'extrait est congelé à -20° . Les protéines totales sont mesurées selon la méthode de "LOWRY (1951)", le glycogène, obtenu par précipitation alcoolique, par la méthode de "DUBOIS (1956)", les lipides sont pesés après extraction selon la méthode de "BLYE et DYER (1959)". Le poids sec et les cendres sont obtenus après séchage à 80° et calcination à 450° . Les enzymes digestives amylase et trypsine sont dans cette étude préliminaire mesurées par les techniques adaptées aux copépodes en l'attente de méthodes valables pour les mollusques SAMAIN et al. (1977)". La laminarinase est dosée selon la méthode décrite dans "HARRIS et al. (1986)".

Le schéma du protocole d'analyses est le suivant :

	400 µl extrait + 500 µl CH ₂ CL ₂ + 100 µl ethanol:
	phase unique, puis V/V:1.8/2/2 (2 phases)
	puis séchage de la phase dichloromethane
	et pesée = lipides
Broyat	500 µl extrait + 100 µl TCA 40 %, reprise
50 000 larves	.5 ml surnageant + 4.5 ml ethanol 90 %,
	précipité dosé par DUBOIS = glycogène.
dans 2 ml eau	200 µl extrait + 1 ml NaOH 2N, LOWRY
distillée	= protéines totales
	100 µl dans nacelle prépesée, 80°,
	24 h = poids sec, 450°, 24 h, = cendres
	500 µl, surnageant, amylase, trypsine, laminarinase.

Observations de l'ingestion : pour contrôler une éventuelle prédation d'une fraction algale poussant dans l'eau issue du vivier, des larves sont mises à jeûner pendant 48 heures dans de l'eau de mer filtrée à 0.22 µm, puis sont placées dans les bacs dont l'eau issue de E ou de V, a séjourné 72 heures à 18°. Les larves sont alors échantillonnées et observées en épifluorescence selon la méthode mise au point par "BABINCHAK et UKELESS (1979)" et précisée par "LUCAS et RANGEL (1981)".

Après 30 minutes, 1 heure 30, 2 heures 30 et 24 heures, l'intensité de la fluorescence émise, qui est variable selon l'état de digestion des algues, est notée. Le nombre et la taille des cellules ingérées sont mesurées.

RESULTATS

Croissance : le bilan final de quatre expériences réalisées en volumes de 400 l à différentes périodes de l'année est rapporté dans le tableau 1. L'eau du vivier (V) se révèle systématiquement plus propice à la croissance des larves de P. maximus. La différence varie entre 18 à 31 % pour la croissance en taille et dans les mêmes proportions pour les autres paramètres (protéines totales, lipides, glycogène, poids sec, cendres) (Tableau 2). La différence de croissance s'accompagne de l'augmentation des rendements en larves pédivéligères en fin d'élevage pour l'eau (V). La différence apparaît dès le début de l'expérience et se développe tout au long de la vie larvaire (fig. 1). Le phénomène est reproductible en volume de 2 l et se trouve renforcé puisque l'écart de croissance peut atteindre 70 % en taille en fin d'expérience. La filtration de l'eau sur 0.22 µm ne modifie pas la croissance des larves élevées dans l'eau (E) habituellement filtrée à 1 µm. Par contre, elle supprime l'effet observé sur l'eau (V) (fig. 2).

Tableau 1 - Principales caractéristiques des élevages larvaires de coquilles St Jacques.
 Comparaison des résultats de croissance obtenus en eau du vivier et en eau extérieure à différentes périodes de l'année.

Date de l'expérience		Nombre départ	Durée	Taille moyenne μ	Croissance journalière moyenne μ/j	Gain de croissance du vivier %	Rendement en pédivelligères
Début	Fin						
5.09.84	8.10.84	2.7 10^6	26 j	V1 204	4,29	18	21
				V2 200			24
				V3 208			29
				E1 192	3,63		14
				E2 186			12
				E3 189			7
							J 26
3.06.85	26.6.85	4.4 10^6	16 j	V1 203	6,93	20	28
				V2 201			32
				V3 197			38
				E1 188	5,79		10
				E2 186			10
				E3 184			12
							J 23
26.11.85	18.12.85	4.3 10^6	22 j	V1 218	5,68	20	-
				V2 214			-
				V3 213			-
				E1 198	4,74		-
				E2 196			-
				E3 197			-
28.05.86	17.06.86	6.0 10^6	21 j	V1 222	6,06	31	33
				V2 219			46
				V3 218			34
				E1 197	4,61		14
				E2 191			12
				E3 187			10
							J 23

Tableau 2 - Composition biochimique des larves D de *Pecten maximus*.
 Les valeurs sont exprimées en nanogramme par larve.

	DECEMBRE		JUN	
	Extérieur	Vivier	Extérieur	Vivier
Taille	197 μ m	215 μ m	192 μ m	220 μ m
Poids sec	786 ng	1 044	370	1181
Matière organique	280	370	-	-
Cendres	506	674	-	-
Protéines totales	130	226	182	221
Lipides	51.3	73.1	-	-
Glycogène	3.1	4.9	-	-

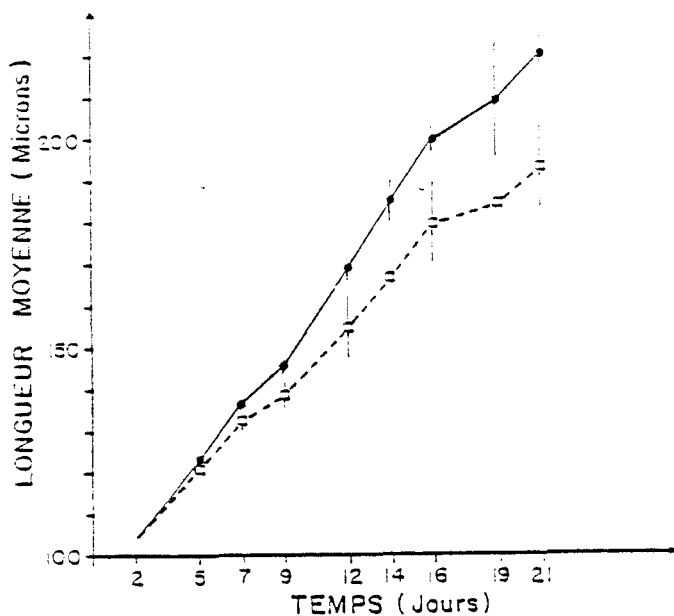


Figure 1

Longueur moyenne et erreur standard à 95 % des larves de *P. maximus* en croissance dans l'eau (V) o, dans l'eau (E) □

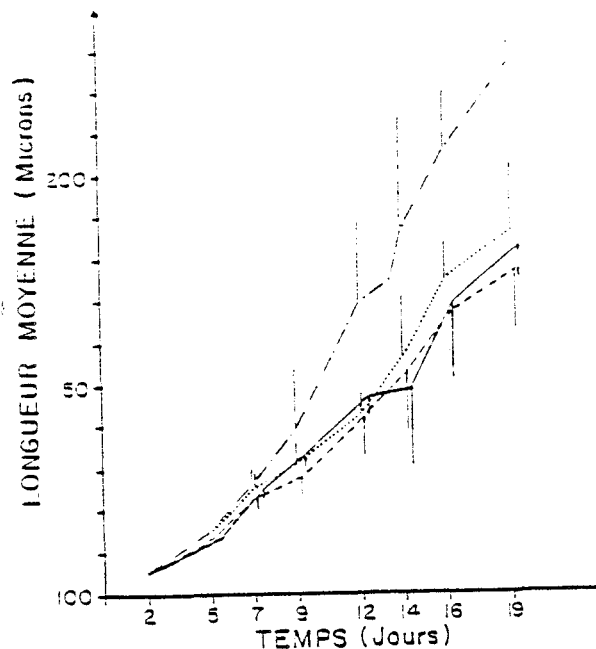


Figure 2

Longueur moyenne et erreur standard à 95 % des larves de *P. maximus* en croissance dans l'eau (V) filtrée à 0,22 µm, dans l'eau (V) filtrée à 0,22 µm, dans l'eau (E) filtrée à 1 µm, dans l'eau E filtrée à 0,22 µm

Analyses chimiques de l'eau

Les deux catégories d'eaux ont été analysées selon les paramètres suivants : S %, pH, $[\text{NH}_4^+]$, $[\text{NO}_2^-]$, $[\text{NO}_3^-]$, $[\text{Si}(\text{OH})_4]$, $[\text{PO}_4^{3-}]$, [COT]. De plus la fraction lipidique et les acides aminés libres dissous (AALD) ont été étudiés en détail. La teneur en $[\text{NH}_4^+]$ apparaît supérieure dans l'eau (V) (0,5 à 0,9 $\mu\text{atg l}^{-1}$) par rapport à l'eau (E) (0,3 $\mu\text{atg l}^{-1}$) en décembre. A la même époque, les nitrates sont également un peu plus élevés dans l'eau V (0,35 à 0,4 $\mu\text{atg l}^{-1}$) que dans l'eau E (0,2 à 0,3 $\mu\text{atg l}^{-1}$).

Les autres sels nutritifs sont en concentration très similaires pour les deux eaux. En décembre, la mesure de carbone organique total (COT) donne des valeurs voisines de 1 mg C l^{-1} quelque soit l'origine de l'eau. En été, l'eau (V) (3200 à 3700 $\mu\text{g C l}^{-1}$) apparaît plus chargée que l'eau (E) (2050 à 2500 $\mu\text{g C l}^{-1}$). L'analyse des lipides révèle des variations importantes entre des prélèvements effectués à des dates différentes, mais ces variations sont tout-à-fait parallèles dans les eaux (E) et (V). En décembre, pour aucun des 37 constituants lipidiques dosés individuellement (27 acides gras, 7 alcools gras et 3 stérols), il n'apparaît de différence évidente. Les teneurs sont conformes aux valeurs habituelles : acides gras totaux (3,6 à 11 $\mu\text{g l}^{-1}$), alcools gras totaux (2,15 à 6,2 $\mu\text{g l}^{-1}$), stérols (0,15 à 0,3 $\mu\text{g l}^{-1}$), pourcentage d'acides gras branchés (2,5 à 6,5 %).

En juin, les acides gras totaux sont supérieurs dans l'eau (V), 32,5 µg/l contre 13,7 µg/l dans (E), ainsi que le rapport ω_7/ω_9 (2.6 contre 0.8) traduisant une plus grande fraction bactérienne dans l'eau V. L'analyse des AALD dans les eaux prélevées en décembre donne des résultats assez similaires, c'est-à-dire qu'il n'apparaît pas de différence constante entre les deux eaux pour un composé identifié. On peut remarquer cependant que les concentrations en AALD totaux sont faibles (de 20 à 40 nM l⁻¹) même pour des eaux hivernales et que l'acide glutamique est plus abondant (3,4 fois en moyenne) que l'acide aspartique alors que le résultat contraire est en général observé. On peut noter également que dans le chromatogramme des eaux (V) apparaît un pic faible mais constant qui n'est pas visible pour les eaux (E) et ne correspond à aucun des 15 acides aminés recherchés. Si ce résultat se confirme, il sera intéressant de rechercher la nature de ce composé aminé.

Bactéries :

Les dénombrements bactériens (fig. 3) ont été principalement effectués au cours des expériences de juin. Dans l'eau extérieure (E), la microflore totale dénombrée en épifluorescence varie de $0,4 \cdot 10^5$ cellules . ml⁻¹ à $38,4 \cdot 10^5$ cellules . ml⁻¹. La filtration (filtre à sable puis filtre à 1µm) a dans l'ensemble peu d'effet sur cette microflore. Dans le bac d'élevage, en fin de cycle d'élevage, les valeurs mesurées sont plutôt inférieures aux valeurs de l'eau qui les remplit.

Dans l'eau du vivier (V), on observe pour l'eau non traitée des densités bactériennes de 5 à 10 fois supérieures à celles trouvées dans l'eau extérieure. Cette différence s'estompe après filtration dans 3 cas sur 7. En ce qui concerne les microflores viables dénombrées sur les milieux 2216 E et TCBS, les deux eaux ont des caractéristiques très proches. La microflore totale viable (2216 E) et les vibriomacées (TCBS) évoluent différemment au cours de l'élevage. Elles sont réduites sensiblement par le procédé de filtration, mais alors que la microflore dénombrée sur 2216 E après 48 heures d'élevage est supérieure d'un facteur 100 à celle de l'eau qui a alimenté le bac, les vibriomacées sont inférieures d'un facteur 10 dans les mêmes conditions.

Les volumes cellulaires des bactéries sont pratiquement identiques pour les deux types d'eau. Ils varient de 0.15 à 0.27 µm³ pour les eaux filtrées. En fin de cycle d'élevage, les volumes cellulaires s'accroissent légèrement et varient de 0.25 à 0.32 µm³.

Il en résulte que les mesures de biomasse effectuées lors de deux des sept cycles d'élevage indiquent quelques différences entre les deux eaux filtrées, à l'avantage de l'eau (V) 13 à 14 µg C/l pour l'eau (E) contre 45 à 63 µg C/l pour l'eau (V).

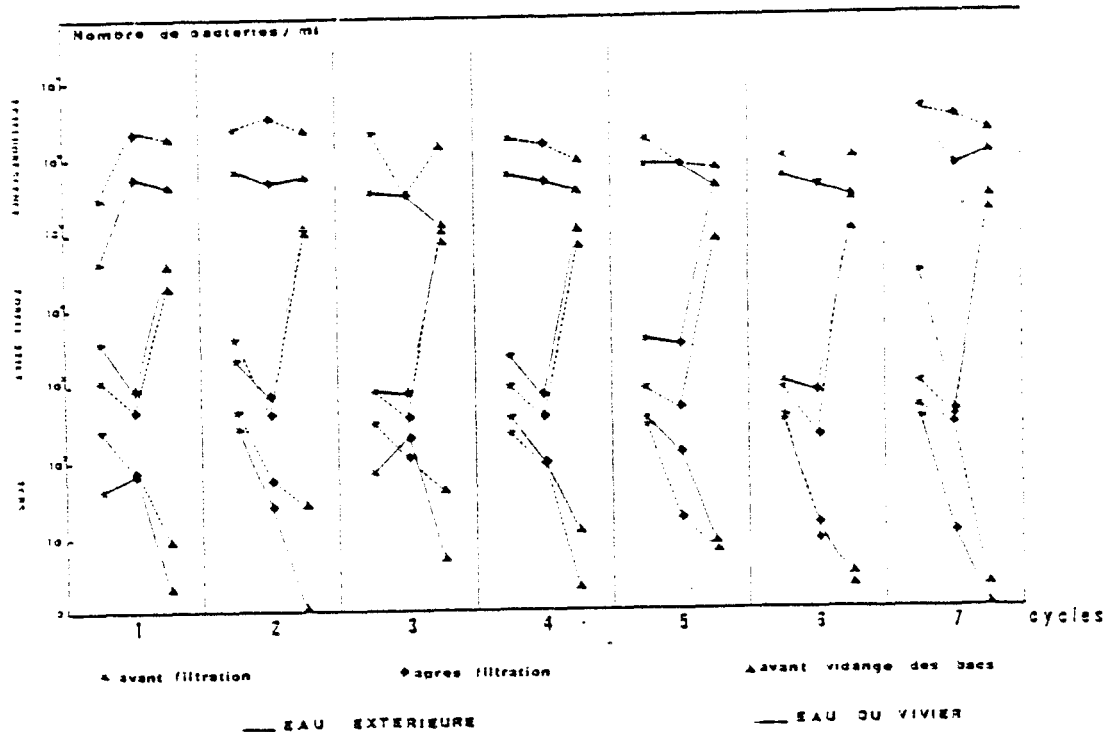


Figure 3 - Dénombrement des bactéries en comptage direct par épifluorescence, sur milieu Lobell 2216 E, sur TCBS dans l'eau (V)... et (E) - , * avant filtration, après filtration, dans le bac d'élevage en présence des larves et de leur nourriture 48 h après le renouvellement d'eau. Observations sur 7 cycles durant l'élevage.

Phytoplancton :

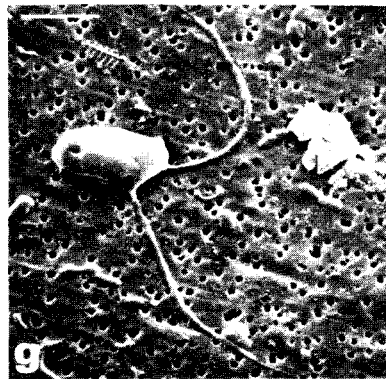
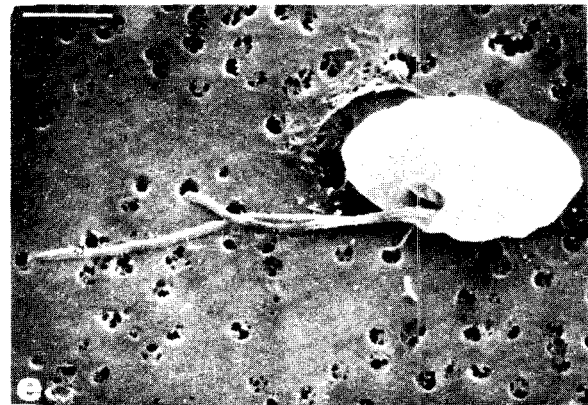
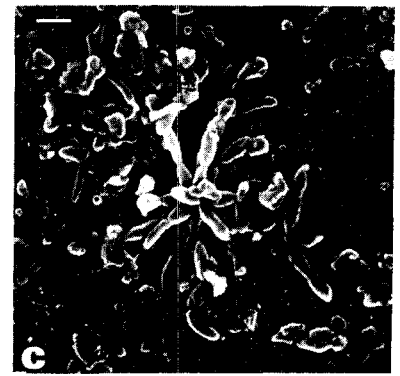
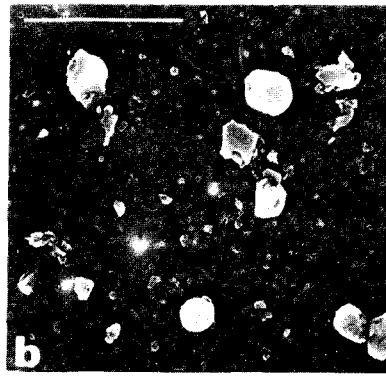
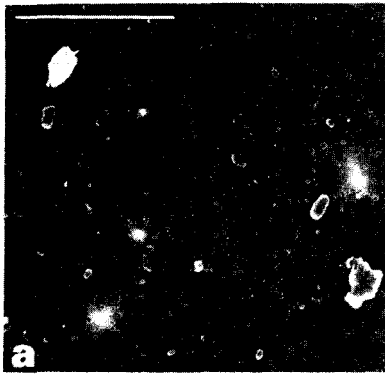
La chlorophylle "a" et les phaeopigments sont faibles, respectivement 0.09 à 0.37 $\mu\text{g l}^{-1}$. Les comptages directs en épifluorescence et sous microscope donnent des concentrations de l'ordre de 330 cellules algales/ml, de taille variant autour de 1 à 2 μm , avec une densité significativement supérieure de 30 % dans l'eau (V) (Test T 95 %). Ces chiffres restent faibles devant la concentration des algues qui sont fournies (50 000 cellules/ml) et qui sont de taille supérieure (5 à 8 μm).

Microscopie à balayage :

La vitesse de filtration à travers des filtres 0.22 μm et 1 μm est très lente pour l'eau (V) suggérant une plus grande charge particulaire qui est confirmée par les observations en microscopie à balayage. Ces particules ressemblent à de nombreux débris, à des bactéries et à des formes de 1 à 2 μm possédant des flagelles (planche 1). L'eau (E) présente moins de débris, possède aussi des bactéries mais ne comporte pas de formes à flagelles.

Production primaire et activité hétérotrophe

La production primaire, mesurée à partir du carbonate ^{14}C est à la limite de détection, par contre une activité hétérotrophe significative a été mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée (fig. 4).



- a Eau extérieure (échelle 10 μm)
 b Eau du vivier (échelle 10 μm)
 c Eau extérieure incubée 48 h avec le milieu de culture des algues fourrage (échelle 1 μm)
 d à h Eau du vivier : formes remarquables. Déterminations sur micrographies par
 M. J. CHRETIENNOT-DINET (comm. pers.) (échelle 1 μm) :
 d Probablement genre *Pyramichlamys* (Chlorophycée)
 e *Hemiselmis virescens* (Cryptophycée)
 f *Pedinomonas mikron* ? (Prasinophycée)
 g Genre *Sphenochloris* ? (Chlorophycée)
 h *Micromonas pusilla* ? (Prasinophycée)

PLANCHE 1

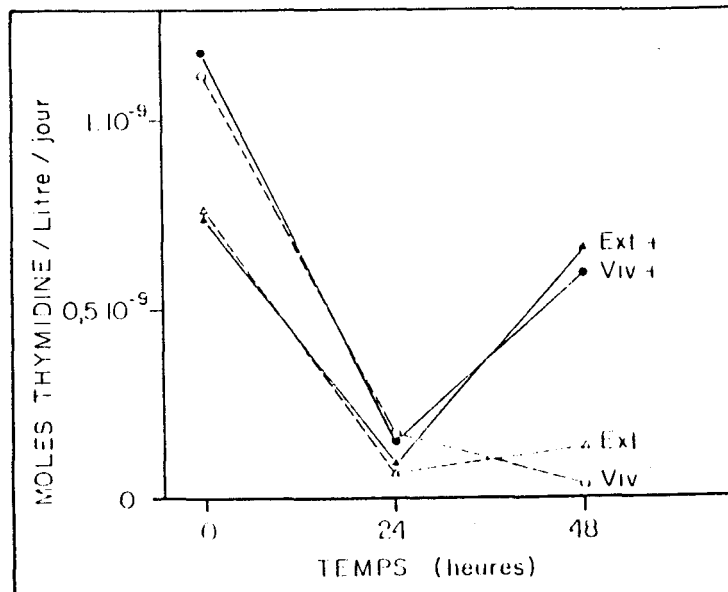


Figure 4 - Incorporation de thymidine H^3 dans la fraction particulaire (retenue sur filtres $0,22 \mu m$) de l'eau filtrée à $1 \mu m$ issue du vivier (Viv) ou de l'eau extérieure (Ext) incubée sans milieu de culture des algues, avec milieu de culture en présence de chloramphénicol et dans les conditions de l'élevage mais sans larves.

Elle est intense au temps zéro malgré la présence d'antibiotiques : l'eau du vivier présente une activité 1,5 fois supérieure à celle de l'eau extérieure. L'addition de milieu de culture où ont séjourné les algues n'apporte pas d'activité hétérotrophe supplémentaire au temps initial de remplissage des bacs. Après 24 heures de vieillissement, l'activité chute fortement. Elle reste faible après 48 heures sauf en présence de milieux de culture des algues où elle reprend de façon égale dans les deux eaux. L'activité spécifique hétérotrophe calculée comme étant le rapport entre la vitesse d'incorporation de thymidine sur le nombre de bactéries varie de 7.10^{-19} à 15.10^{-19} moles de thymidine/bactérie/jour, si l'on tient compte des comptages directs en épifluorescence. Les calculs sont sous-estimés car le nombre de bactéries actives est inférieur au nombre total de bactéries.

Observations des larves :

L'observation en épifluorescence, des larves préalablement mises à jeûner, puis réparties dans les deux eaux (V) et (E) sans apport d'algues, montre qu'elles ingèrent quelques algues dont la taille dans plus de 50 % des cas est inférieure à $2 \mu m$ (fig. 5). Dans l'expérience de décembre, les larves ont été mises en contact de l'eau (V) ou (E) dès le remplissage des bacs. Une coloration progressive en rose des larves consécutive à la digestion d'algues a été observée avec une tendance plus rapide pour l'eau (V). La deuxième expérience (juin), effectuée sur l'eau vieillie 48 heures, a permis d'observer chez les larves s'alimentant, l'ingestion de 1 à 5 cellules par larve dans la même gamme de taille. En volume de 5 l, de 10 à 20 % des larves se nourrissent d'algues contre 30 à 40 % en bacs de 450 l qui disposent en fait d'une quantité d'algues 100 fois supérieure par larve. Des différences d'ingestion sont observées selon l'origine de l'eau mais sont contradictoires selon les expériences, ce qui ne permet pas de conclure sur ce point.

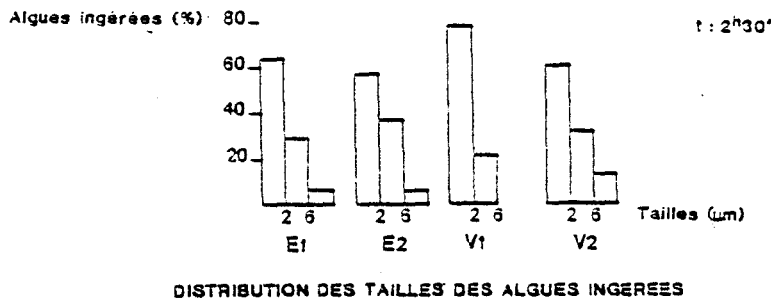
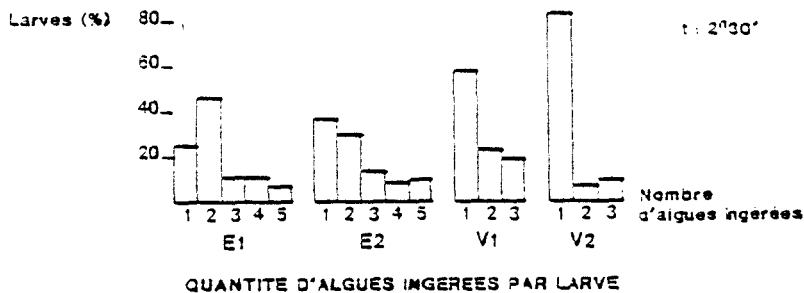


Figure 3 - Haut - Expérience de juin : pourcentage de larves alimentées ayant 1 à 5 algues dans l'appareil digestif après 2 h 30 de mise en contact avec l'eau incubée 24 h dans les conditions d'élevage sans larves. E, eau extérieure, V eau de vivier, (1) incubées sans milieu de culture, (2) incubées avec milieu de culture.

Bas - Pourcentage d'algues ingérées dans les classes de tailles inférieures à 2 µm, entre 2 et 6 µm, supérieures à 6 µm.

Activités des enzymes digestives :

Les niveaux des activités des enzymes digestives sont différents selon l'origine des larves (tableau 3) : en décembre, l'activité de l'amylase en fin d'élevage (J16) était significativement supérieure pour l'élevage en eau (V) alors que la trypsine était identique. En juin, les activités mesurées (amylase, laminarinase, trypsine) étaient significativement supérieures pour l'élevage en eau (V) à la même date. Par contre, aucune activité n'a pu être décelée aux jours J2 et J9.

Discussion :

L'ensemble des mesures effectuées au cours de la croissance larvaire de *P. maximus* montre qu'il existe pour les larves, malgré la filtration à 1 µm, une différence de qualité entre l'eau qui a séjourné dans le vivier et l'eau pompée à l'extérieur de celui-ci, à marée haute. La filtration à 0.22 µm, en supprimant l'effet observé, montre que cette différence ne provient pas d'un effet défavorable de l'eau (E), mais au contraire, résulte d'un facteur favorable de l'eau du vivier. Ce facteur, n'affecte pas un stade particulier, mais concerne l'ensemble de la vie larvaire. La nature de la membrane filtrante à 0.22 µm (nylon hydrophile) associe, selon le fabricant, la rétention des particules par tamisage à la rétention par absorption. Compte tenu des volumes filtrés, l'absorption en totalité d'une fraction active dissoute reste peu probable, ceci demande à être vérifié. Il n'est donc pas possible, pour l'instant, de conclure définitivement à la

Tableau 3 : Activité par individu et activité spécifique de l'amylase (A), de la trypsine (T) et de la laminarinase (L) des larves de *P. Maximus* élevées sur l'eau filtrée issue du vivier (V) ou de la mer ouverte (E), teneur en protéines totales (Pt) en décembre et en juin. *test T, différence significative au seuil de 5 %, NS non significative.

	DECEMBRE		JUIN	
	E	V	E	V
10 ⁻⁶ AMYLASE/i	2.9	* 4.5	5.8	* 9.7
10 ⁻⁶ TRYPSINE/i	324	NS 315	9.5	* 43.0
10 ⁻⁶ LAMINA./i	-----		.17	* .33
10 ⁻⁶ A/P _t	0.016	* 0.020	.032	* .043
10 ⁻⁶ T/P _t	1.8	* 1.39	.054	* .185
10 ⁻³ L/P _t	-----		.94	* 1.45
ng. Protéines totales	180.0	* 225.9	180.9	* 224.6

nature particulière du facteur de croissance. Par contre, il se situe dans une fraction qui passe à travers les filtres à 1 µm. On dispose, avec les membranes 0.22 µm, d'un moyen de le concentrer. La persistance du phénomène en petits volumes permet d'envisager des expérimentations plus nombreuses. La permanence de cet élément aux diverses périodes testées, permet d'avancer que le facteur a un cycle saisonnier peu marqué, ou qu'il est potentialisé par les conditions d'élevage qui sont identiques au cours de l'année.

La comparaison des compositions chimiques des eaux des deux origines fait apparaître quelques différences (NH₄, NO₂, COT). Les valeurs d'NH₄ et NO₂ plus élevées dans le vivier pourraient résulter du confinement de l'eau et d'un processus plus important de reminéralisation de la matière organique. L'écart estival du carbone organique total (COT) est significatif en été, mais on ne dispose pas d'assez de données en hiver pour l'affirmer statistiquement. Par contre, ces valeurs sont élevées puisqu'elles représentent en hiver et en été, respectivement 2 fois et 5-7 fois, l'apport journalier de carbone du phytoplancton de culture. (La contribution de la nourriture serait de 360 µg carbone/1/jour). Cependant, elles résultent probablement de la contribution du chloramphenicol (8 mg/l). Enfin, en juin, les acides gras caractéristiques des bactéries (branchés en 18-1 ω7) sont plus abondants dans l'eau (V) que dans l'eau (E) ce qui confirme certains des résultats de l'analyse bactériologique.

Les différences de dénombrements bactériens par épifluorescence pourraient constituer un facteur explicatif. Cependant, si ces différences sont nettes pour les eaux non traitées, elles disparaissent dans 3 cas sur 7 pour les eaux filtrées et peuvent s'atténuer au cours de l'élevage. Enfin, les résultats obtenus en hiver ont montré une grande similitude des deux eaux, qu'elles soient traitées ou non. Les volumes cellulaires des bactéries étant très proches dans les deux cas, les plus fortes biomasses correspondent donc aux fortes abondances. Le léger accroissement en volume des bactéries observé en fin de cycle d'élevage compense en biomasse la légère diminution observée en nombre. Après 48 h, l'augmentation du nombre des bactéries hétérotrophes marines viables peut résulter, soit de la prolifération de souches résistantes, sélectionnées par l'antibiotique et provenant de l'eau d'élevage ou des algues, soit plus simplement de la contribution des bactéries des algues et des larves dont l'apport a été estimé à 10^4 cellules ml^{-1} en concentration finale. Le nombre de germes vibrioides diminue grâce à l'effet du chloramphénicol ou du système biologique larves + algues. Par contre, l'antibiotique n'affecte pas le nombre total de cellules bactériennes comptées en épifluorescence qui peuvent donc constituer une biomasse disponible de l'ordre de 10 % de celle du phytoplancton.

Le nombre de cellules chlorophylliennes est faible devant la quantité d'algues apportées aux élevages. L'absence d'incorporation de ^{14}C tendrait à montrer qu'elles ne sont pas spécialement productives, la différence de 30 % observée en nombre ne pourrait expliquer le phénomène que si les algues apportent un élément essentiel à l'élevage ou sont hétérotrophes. La productivité ^{14}C de ces fractions sera à contrôler à nouveau car leur faible nombre pose des problèmes de sensibilité pour détecter le ^{14}C incorporé. La charge particulière qui paraît plus importante dans l'eau (V) constitue une différence marquante (planche 1), la microscopie à balayage a permis de constater que ces particules n'ont en général pas de forme identifiable, il sera nécessaire d'en préciser la nature chimique et la capacité des larves à les ingérer. Elle s'accompagne de la présence d'assez nombreuses formes à flagelles, inexistantes dans l'eau (E) et dont on ne connaît pas la nature (végétale ? degré d'hétérotrophie ?). Il ne semble pas que l'incubation de l'eau pendant 48 h dans l'écloserie, avec ou sans milieu de culture des algues, modifie sensiblement la nature et la densité de ces formes flagellées. Le vieillissement de l'eau se traduit par contre, par l'apparition de grandes bactéries libres pour l'eau (V) ou en amas pour l'eau (E) ayant reçu du milieu de culture (planche 1). Ces bactéries pourraient correspondre à une fraction active de peuplement telle que celles dénombrées sur le milieu 2216 E, et dont la diversité métabolique s'est considérablement réduite pendant le cycle d'élevage, vraisemblablement sous la pression sélective du chloramphénicol. Elles pourraient expliquer la reprise d'activité hétérotrophe à 48 heures (thymidine tritiée).

La différence de productivité hétérotrophe, au temps zéro en présence d'antibiotiques, est importante, d'autant que le taux d'incorporation est de 3 à 5 fois celui mesuré par "FUHRMAN et AZAM (1982)" pour une eau oligotrophe. Il n'est pas encore possible de savoir si cette activité résulte de bactéries ou des organismes flagellés observés. L'autoradiographie devrait permettre de répondre à cette question.

Les différences de nombres de bactéries ou de flagellés associées à un taux élevé de productivité hétérotrophe ainsi que la charge particulaire de l'eau (V) constituent des pistes possibles pour l'identification d'un facteur de croissance qui ne serait pas forcément observable directement en épifluorescence. Par contre, l'activité hétérotrophe enregistrée après 48 heures en présence d'un milieu de culture des algues, ne peut être un facteur explicatif puisque l'eau (V) et (E) sont identiques pour cette observation. Dans le cas des bactéries dont les densités sont voisines, il faudrait envisager des différences qualitatives sensible entre les deux peuplements, différences se traduisant au niveau de la valeur nutritionnelle ou de la production pour certaines d'entre elles, de facteurs de croissance.

Le vieillissement de l'eau dans les conditions étudiées (c'est-à-dire sans larves) ne semble potentialiser qu'une production de grandes bactéries peu diversifiées. D'autres expériences comportant aussi des larves devront compléter cet aspect.

L'observation de l'ingestion de petites fractions algales, prouve la capacité des larves à capter des classes de taille $< 2 \mu\text{m}$. Le faible nombre de cellules algales observées dans l'appareil digestif, associé à une productivité apparemment normale de ces fractions, ne pourrait être un facteur explicatif que si ces algues étaient hétérotrophes ou contenaient un élément qualitativement important pour la croissance. Deux restrictions demeurent :

- 1 - Vérifier la valeur de la productivité de ces fractions
- 2 - Leur digestion pourrait être très rapide expliquant le faible nombre de cellules observées à la fois dans le tractus digestif.

L'activité plus grande des enzymes digestives des larves issues de l'eau (V) est reproductible pour l'amylase. Cela suggère l'existence d'une différence dans la quantité d'amidon ingérée. La plus forte activité des trois enzymes en juin et en fin d'expérience, l'absence d'activité détectable à J2 et J9 appellent d'autres expériences pour interpréter ces résultats, à savoir, mise à jeûn et suivi de la réponse enzymatique par un excès ou par absence de substrat "SAMAIN et al. 1986".

Les résultats préliminaires ne permettent pas de savoir pour l'instant si l'effet résulte d'une activation de la vitesse d'ingestion. L'hypothèse d'une fraction particulière potentialisée par les conditions d'élevage paraît peu probable. Le facteur tirerait son origine du vivier et serait plutôt particulière et/ou de nature hétérotrophe. La possibilité de le concentrer sur filtre à 0.22 µm et de travailler au petits volumes permet d'envisager la multiplication de tests pour investiguer cette question.

REMERCIEMENTS

Ce travail a pu être réalisé grâce à l'efficacité de l'équipe de l'écloserie d'Argenton : M. HUITRIC, M. MAZURET et P. MINER.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMINOT, A., et CHASSEPIED, M., 1983. Manuel d'analyses chimiques en milieu marin CNEOX (COB). Brest, France : 395 pp.
- BABINCHAK, J., et UKELESS, R., 1979. Epifluorescence microscopy, a technique for the study of feeding. in Crassostrea virginica veliger larvae. Mar. Biol., 51 : 69-76.
- BLIGH, E.G., et DYER, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. 37 (8), 911 -917.
- BUESTEL, D., COCHARD, J.C., DAO, J.C., et GERARD, A., 1982. Production artificielle de naissain de coquilles Saint-Jacques Pecten maximus (L) : Premiers résultats en rade de Brest. Vie Marine, 4 : 24-28.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., et SMITH, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry, 28 : 350-356.
- FRY, J.C, et DAVIES, A.R., 1984. An assessment of methods for measuring volumes of planktonic bacteria, with particular reference to television image analysis. Journal of Applied Bacteriology 57,000-000.
- FUHRMAN, J.A., et AZAM, F., 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters : Evaluation and field results. Mar. Biol. 66 : 109-120.

- GRUFFYDD, Ll., et BEAUMONT, A.R., 1970 : Determination of the optimum concentration of eggs and spermatozoa for the production of normal larvae in Pecten maximus (Mollusca, Lamellibranchia). Helgoländer wiss. Meeresunters, 20 : 486-497.
- HARRIS, R.P., SAMAIN, J.F., MOAL, J., MARTIN-JEZEQUEL, V., et POULET, S.A., 1986. Effects of algal diet on digestive enzyme activity in Calanus helgolandicus. Marine Biology, 90 : 353-361 pp.
- HOBBIE, J.E., DALEY, R.J. et ASPERS, J., 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. Environmental microbiology, vol. 33, n° 5 : 1225-1228.
- KOROLEFF, F., 1969. Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. Int. Con. Explor. Sea. C.M., 1969/C : 9 : 4 p.
- KOBAYASHI, T., ENOMOTO, R., SAKAZAKI, R., et KUWAHARA S., 1963. A new selective isolation medium for pathogenic vibrios : TCBS agar. Jap. J. Bact. 18 : 387-391.
- LE PENNEC, M., et PRIEUR, D., 1977. Developpement larvaire de Mytilus edulis (L.) en présence d'antibiotiques. Première partie : détermination des concentrations actives non toxiques de quatre antibiotiques Aureomycine, erythromycine, chloramphenicol et sulfamerazine. Rev. Intern. Oceanogr. Méd, 28 : 167-179.
- LUCAS, A., et RANGEL, C.O., 1981. Vitesse d'ingestion et de digestion du phytoplancton observés au microscope à épifluorescence chez les larves de Mytilus edulis (L.) (Bivalvia, Mollusca) Haliotis, 11 : 171-180.
- MANAGAU, L.M., et MADEC, C.L., 1985. Dosage par HPLC des acides aminés présents dans le milieu marin. Oceanis 11 (5) : 383-97.
- MARTY, Y., 1976. Méthode de dosage des acides gras libres dissous dans l'eau de mer. Application à l'étude de leurs variations dans les eaux de la rade de Brest. Thèse 3ème cycle. Université de Bretagne Occidentale. BREST.
- MENZEL, D.W., et VACARO, R.F., 1964. The measurement of dissolved and particulate carbon in seawater. Limnol. Oceanogr. 9 : 138-142.
- OPPENHEIMER et ZOBELL, C.E., 1952. The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. J.Mar. Res, 11 : 10-18.

SAMAIN, J.F., et DANIEL, J.Y. et LE COZ, J.R., 1977. Trypsine, amylase et protéines du zooplancton : dosage automatique et manuel. J. Exp. Mar. Biol. Ecol, 29 : 279-289.

SAMAIN, J.F., WILLIAMS, R., et MOAL, J., 1986. Response of the digestive enzymes of copepods to starvation. Marine Biology, sous presse.

TREGUER, P., et LE CORRE, P., 1975. Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer (utilisation de l'autoanalyseur II Technicon) 2ème édition. Université de Bretagne Occidentale.

YENTSCH, C.S., et MENZEL, D.W., 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. Deep Sea Res. Part. A., 10 : 221-31.