



### Fiche Bio 2008-02 : Biosécurité en éclosion : le rinçage des *Artemia*

D. Pham, E. Vourey, D. Ansquer, E. Walling

Contact : dpham@ifremer.fr

#### Introduction

La crevette bleue *Litopenaeus stylirostris* est élevée en Nouvelle-Calédonie grâce à la maîtrise du cycle biologique complet de l'animal. L'élevage débute par la production de larves en éclosion, destinées à l'ensemencement des bassins en terre de grossissement. Lors de récents épisodes de mortalités déclarés par des éclosiers privés de la filière calédonienne, l'aspect bactériologique de la production de larves a été étudié. Le caractère aléatoire et imprévisible des mortalités, malgré l'utilisation d'un protocole d'élevage éprouvé sur plusieurs années, laisse penser que ces mortalités sont reliées à des dérèglements bactériologiques (Vadstein, 1997). Un équilibre microbien instable s'établit dans l'eau d'élevage des larves et la moindre perturbation d'ordre environnemental ou physiologique peut faire basculer cet équilibre en faveur de bactéries opportunistes, voire pathogènes (Tolomei *et al.*, 2007).

Afin de diminuer les risques de prolifération de bactéries nuisibles dans l'éclosion, les organisations internationales comme la FAO et l'OIE préconisent la mise en place de mesures de biosécurité (FAO, 2003 ; OIE, 2003). Celles-ci permettent de limiter la multiplication et la dispersion des agents pathogènes que ce soit entre les bacs, les éclosiers, les régions de production ou les territoires. L'objectif de cette fiche biotechnique est de souligner, à l'échelle du bac larvaire, les possibles voies d'entrée des bactéries et d'illustrer l'effet d'une mesure simple de biosécurité sur la qualité microbiologique d'un des intrants : les *Artemia*.

#### Identification des étapes à risque bactériologique pendant une production de post-larves

Un bac d'élevage larvaire en éclosion privée a été suivi de J0 à J8, date à laquelle la vidange du bac a été réalisée du fait de la faible survie. Une visite quotidienne de l'éclosion a été effectuée afin de noter les interventions zootechniques, observer le comportement des larves, prélever différents échantillons pour l'analyse bactériologique. La flore hétérotrophe totale (FHT) et la flore vibrionacée (FV) ont été dénombrées régulièrement sur l'eau du bac et les larves (figure 1). Tous les intrants du bac ont aussi été analysés lors de leur première utilisation : eau de la réserve, algues, microparticules, *Artemia*. L'analyse des microparticules et des *Artemia* est répétée 3 et 4 fois respectivement.

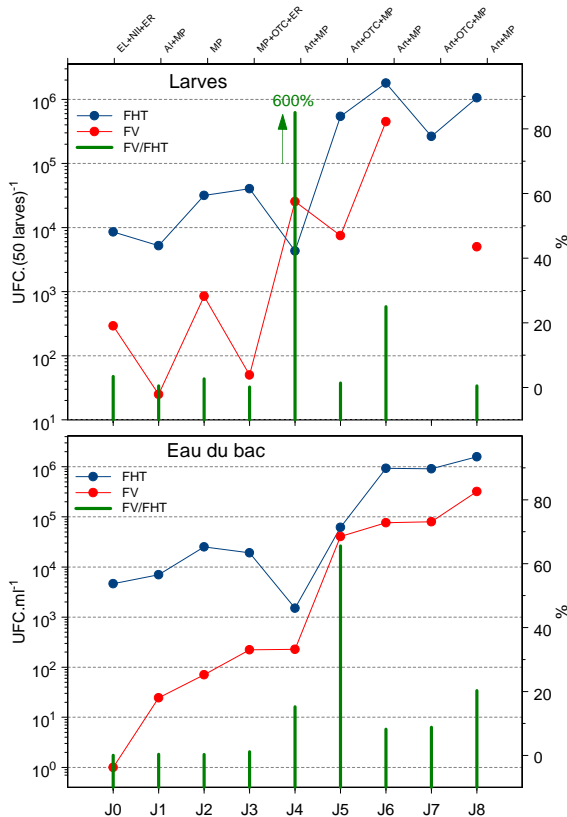


Figure 1 : Suivi bactériologique des larves et de l'eau d'un bac en production, avec succession des intrants (EL = Eau de Livraison, NII = nauplii, ER = Eau de la Réserve, Al = algues, MP = microparticules, OTC = Oxytétracycline, Art = *Artemia*)

De manière générale, les populations de FHT et de FV augmentent progressivement au cours de l'élevage ce qui est facilement explicable par les conditions optimales de croissance bactérienne qui règnent dans un bac d'élevage (température, pH, salinité, disponibilité des nutriments). La FHT est généralement plus concentrée que la FV, néanmoins deux évènements sont venus troubler cette dynamique lors du suivi :

1. A J4, la FHT chute d'une unité logarithmique, que ce soit au niveau de l'eau ou des larves.
2. A J5, la proportion de FV par rapport à la FHT augmente brusquement sur les larves et 1 jour après dans l'eau. L'équilibre de la FHT par rapport à la FV se rétablit par la suite.

Pour comprendre les évènements observés à J4 et J5, il faut analyser le protocole d'élevage avant J4. A J3 ont été introduits les microparticules, l'oxytétracycline et de l'eau de réserve. Le facteur qui a le plus probablement diminué la FHT à J4 est l'antibiotique. Il est intéressant de noter que malgré une

diminution passagère de la FHT, les niveaux bactériens sont vite rétablis à partir de J5-J6, alors que l'antibiotique est réintroduit régulièrement. De plus, dans cette expérimentation, il n'est pas possible d'observer l'effet inhibiteur de l'antibiotique sur la flore vibronacée, population pourtant ciblée par le traitement. Le rôle des antibiotiques en élevage larvaire, qui initialement devaient permettre de maîtriser le développement de bactéries nuisibles, semble être mitigé ici. Le premier ajout d'antibiotique a bien un effet sur la FHT, mais pas d'effet observable sur la FV. Il serait utile de réévaluer l'effet de l'antibiotique sur ces deux groupes de bactéries.

A J4, les *Artemia* sont introduits pour la première fois dans le bac, accompagnés de microparticules. L'élévation brusque de la flore vibronacée s'explique probablement avec l'apport d'*Artemia* dont la préparation est connue pour être un vecteur de *Vibrio* en aquaculture (López-Torres et Lizárraga-Partida, 2001). En effet, l'analyse bactériologique des intrants révèle que l'apport principal de FV se fait avec les *Artemia* dont la charge est de l'ordre de  $10^4$ - $10^5$  CFU / 50 *Artemia*.

Deux effets contradictoires sur la flore bactérienne résultent de pratiques zootechniques concomitantes : l'apport de *Vibrio* par les *Artemia* et l'inhibition attendue par l'antibiotique de ces bactéries. Afin de concilier ces deux actions, le rinçage des *Artemia* est abordé dans ce qui suit.

### Utilité du rinçage des *Artemia* avant la distribution

La séquence alimentaire de l'élevage larvaire de *L. stylirostris*, tel qu'il est pratiqué à la Station Aquacole de Saint-Vincent, contient des microparticules et des proies vivantes de l'espèce *Artemia salina*. Les cystes d'*Artemia* sont mis à éclore et incubés 24 heures avant leur utilisation. Il est recommandé de rincer les *Artemia* à l'eau douce avant de les distribuer aux bacs en production (Pham, 2003). Au cours des années, certaines pratiques de terrain ont dérivé du protocole original, comme c'est le cas par exemple du rinçage des *Artemia* qui est souvent omis. En effet, les éclosiers ont remarqué que les larves présentaient une meilleure appétence pour les *Artemia* non rincés. Ce constat nous amène à reconsidérer l'utilité du rinçage des *Artemia*.

La littérature et les suivis bactériologiques des bacs réalisés à la station et dans une éclosion privée ont permis l'identification des *Artemia* comme source principale de FV (cf. partie 1). Afin de révéler le rôle du rinçage sur la qualité microbiologique des *Artemia*, la charge microbienne de cet intrant a été analysée selon trois modalités : non-rincé, rincé à l'eau de mer, rincé à l'eau douce. Pour ce faire, des cystes d'*Artemia*, préalablement désinfectés (0,3 g d'hypochlorite de calcium (chlore en poudre) à 65 % dans 1 litre d'eau pour 50 g de cystes) ont été mis à éclore à raison de 1 g de cystes par litre. Des

analyses bactériologiques de l'eau de mer et des cystes avant incubation ont été effectuées. Après 24 heures d'incubation, des étalements bactériens ont été réalisés à nouveau sur l'eau d'incubation, mais également sur les *Artemia* éclos ainsi que sur l'eau de rinçage (eau de mer et eau douce). Les résultats sont présentés dans les figures 2 et 3. Ces expérimentations ont été répétées 2 fois. Les niveaux bactériens sont variables mais les ordres de grandeurs relatifs restent les mêmes.

L'eau du bac d'incubation après éclosion des *Artemia* contient les concentrations en FHT et FV les plus élevées. Leur niveau est multiplié par 1000 après 24 heures. La production d'*Artemia* est donc une étape qui favorise le développement bactérien en éclosion (figure 2). Des études ont montré que les bactéries qui se développaient pendant l'incubation des cystes ne provenaient pas forcément des préparations commerciales mais de l'environnement de l'éclosion (López-Torres *et al.*, 2001). De ce fait, « l'empreinte bactérienne » de l'éclosion, qu'elle soit bénéfique ou nuisible en fonction de l'historique des productions, est amplifiée pendant la préparation des *Artemia*.

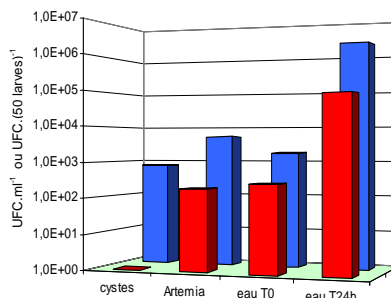


Figure 2 : Préparation des *Artemia* : répercussions sur la flore bactérienne (bleu : FHT, rouge : FV)

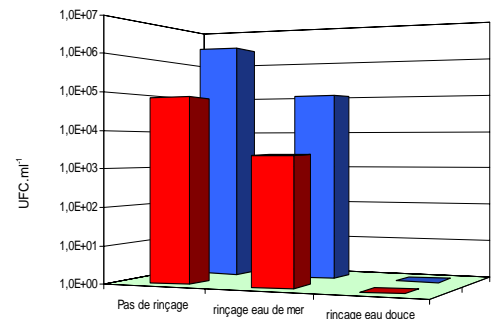


Figure 3 : Effet du rinçage sur l'apport de bactéries par l'eau d'incubation des *Artemia* (bleu : FHT, rouge : FV)

Le corps des *Artemia* est une source significative de bactéries. Le rinçage permet d'éliminer une partie des bactéries à la surface des *Artemia* mais surtout d'éliminer l'eau d'incubation et donc, de diminuer la concentration des bactéries introduites dans le bac (figure 3). La qualité bactériologique de l'eau de mer de rinçage est variable et dépend de plusieurs paramètres (période de pompage, qualité de la filtration, renouvellement de la réserve...). Le rinçage à l'eau douce apparaît comme le moyen le plus efficace pour limiter l'apport en bactéries. Toutefois, il convient de ne pas conserver les proies vivantes dans l'eau douce, pour des raisons de survie des proies vivantes, et de les distribuer dans le ¼ d'heure qui suit le rinçage.

Le rinçage des *Artemia* permet donc de diminuer les risques de déséquilibres bactériens et d'introduction de pathogènes dans le bac en cours de production. La maîtrise de la microflore rend le traitement à l'antibiotique plus efficace car la quantité de bactéries à inhiber est diminuée. Cette expérimentation permet de prendre conscience que les pratiques zootechniques ont toujours un impact sur la microflore des bacs même si elle reste difficile à caractériser en élevage larvaire.

## Conclusion

Comme pour toute population, la concentration des animaux en aquaculture rend le milieu propice à l'apparition de maladies (Kautsky *et al.*, 2000). Tout l'art de l'aquaculteur est de créer un environnement favorable pour que ces populations se développent dans des conditions d'exposition minimale aux pathogènes. Les mesures de biosécurité ne cherchent pas à rendre l'environnement de l'éclosion aseptisé, mais plutôt à stabiliser la microflore naturelle afin qu'elle occupe l'écosystème à la place d'espèces opportunistes ou pathogènes. La connaissance de la microflore bénéfique et des moyens pour la favoriser en éclosion pourraient faire l'objet d'études plus approfondies. D'autre part, l'utilisation de techniques spécifiques pour minimiser le risque d'introduction de pathogènes (filtration, stérilisation, ozonation de l'eau, décontamination des *Artemia*) devrait permettre d'améliorer la biosécurité des élevages.

## Remerciements

Ce travail a été réalisé en coopération avec les éclosiers privés et grâce aux échanges avec D. Goxe, P. Blazer, R. Bador, et J.-P. Mathelon.

## Glossaire

**Biosécurité** : procédures mises en place afin de prévenir l'apparition de maladies et leur dissémination.

**FAO** : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture.

**Flore hétérotrophe totale** : ensemble des microorganismes qui se développent en présence d'oxygène sur un milieu non sélectif et riche en nutriments, le milieu **ZoBell**. Le terme « hétérotrophe » signifie que ces microorganismes puisent dans le milieu les sources organiques de carbone dont ils ont besoin pour se multiplier.

**Flore vibrionacée** : ensemble des microorganismes pouvant se développer sur un milieu sélectif pour les bactéries du genre *Vibrio* : le milieu **TCBS** (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose). Ce milieu, développé à l'origine pour la détection de *Vibrio cholerae*, permet de favoriser le métabolisme des Vibrios et d'inhiber les entérobactéries. En aquaculture, il permet de cultiver les principales espèces de Vibrios marins sauf *Vibrio penaeicida* et *Vibrio nigripulchritudo*.

**OIE** : Organisation mondiale de la santé animale.

**TCBS** : cf. flore vibrionacée.

**ZoBell** : cf. flore hétérotrophe totale.

## Références

**FAO** 2003. Health management and biosecurity maintenance in white shrimp (*Penaeus vannamei*) hatcheries in Latin America. FAO Fisheries technical paper 450 (<http://www.fao.org>).

**Kautsky** N., Ronnback P., Tedengren M. et Troell M. 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191: 145-161.

**López-Torres** M. A. et Lizárraga-Partida M. L. 2001. Bacteria isolated on TCBS media associated with hatched *Artemia* cysts of commercial brands. *Aquaculture* 194: 11-20.

**OIE** 2003. Manual of Diagnostics Tests and Vaccines for Aquatic Animals. 4<sup>th</sup> Edn. Office International des Epizooties, Paris. ([http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A\\_summry.htm](http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm)).

**Pham D.** 2003. Protocole d'élevage larvaire à la Station Aquacole de Saint-Vincent, IFREMER, Nouvelle-Calédonie, document de référence interne.

**Tolomei** A., Burke C., Crear B., et Carson J. 2004. Bacterial decontamination of on-grown *Artemia*. *Aquaculture* 232: 357-371.

**Vadstein** O. 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture* 155: 401-417.