

## INFLUENCE DU pH SUR LA COMPOSITION EN LIPIDES ET EN ACIDES GRAS DU ROTIFERE *BRACHIONUS PLICATILIS*

Neïla HAMZA\* et Jean ROBIN\*\*

\*Institut National des Sciences et Technologies de la Mer  
28, rue du 2 mars 1934, 2025 Salammbô, Tunisie

\*\* Unité mixte de Nutrition des Poissons IFREMER Brest B.P. 70, 29280 Plouzané, France

### ملخص

قمنا بدراسة تأثير نسبة الحموضة " pH " على تركيبة الدّولابيات من الحوامض الدهنية بإدخال تغييرات على هذه النسبة في ثلاثة أوساط تربوية مختلفة. تتراوح الحموضة في الوسط الأول ما بين 5 و 6 وفي الوسط الثاني ما بين 7 و 8 بينما تتراوح في الوسط الثالث ما بين 9 و 10.

كانت تغذية الدّولابيات تتكوّن من خميرة الخبز والزيت المخلوطين في الماء. وبعد عشرة أيام من هذه التغذية قمنا بتحليل الدّولابيات من حيث تركيبها الدهنية، فأتضح لنا أنّ نسبة الدهنيات فيها لم يطرأ عليها تغيير ذو أهمية، بينما نسبة الحموضة في الأوساط التربوية كان لها تأثير ملموس على الحوامض الدهنية.

ويمكن لنا أن نلخص هذه الدراسة في أنّ تغيير نسبة الحموضة في الوسط التربوي ينجر عنه تحسّن في كمّية الحوامض الدهنية الأساسية في الدّولابيات مما يساعد على تسديد حاجيات يرقات الأسماك البحرية.

### RESUME

L'influence du pH du milieu sur la composition en acides gras de *Brachionus plicatilis* a été étudiée en ajustant le pH de cultures semi-continues de rotifères. Deux groupes ont été soumis à un pH variant entre 5 et 6, deux autres entre 9 et 10, les deux témoins (pH non modifié) ayant un pH variant de 7 à 8. Les rotifères ont été nourris avec un aliment à base de levure de boulangerie et d'huile émulsifiée.

Les rotifères ainsi produits ont été analysés après 10 jours de traitement. La teneur en lipides ne varie pas de façon significative. Une nette influence du pH est remarquée sur la composition en acides gras et notamment sur les acides gras longs polyinsaturés de la série n-3 dont les teneurs sont plus importantes à pH acide et surtout basique qu'à pH neutre. Ceci s'effectue au détriment des acides gras de la série n-7. La différence la plus remarquable concerne l'acide docosahexaénoïque (C22:6n-3), maximale à pH basique. La manipulation du pH des cultures peut donc être une technique permettant d'améliorer la teneur des rotifères en acides gras essentiels afin de couvrir les besoins des larves de poissons marins.

**Mots clés :** Rotifères, pH, lipides, acides gras, proies vivantes

### ABSTRACT

The influence of pH of rotifer culture medium on the fatty acid content of rotifers was studied. The pH of rotifer semi-continuous cultures was daily adjusted either at pH 5 to 6, either at pH 9 to 10, while the pH of the untreated control group varied from 7 to 8. Rotifers were fed with a mixture of baker's yeast and emulsified oil. After 10 days, rotifer fatty acid composition of each tank was analysed. Total lipid content did not change between treatments. A clear pH influence was noticed on Long Chain Polyunsaturated n-3 fatty acids content at the expense of the n-7 monounsaturated fatty acids. The acid and mainly basic treatments led to higher levels of n-3 highly unsaturated fatty acids in rotifers than neutral pH. The main difference concerned docosahexaenoic acid (C22:6n-3) with the highest value observed in rotifers cultures at alkaline pH.

pH monitoring of the cultures can be a means to improve rotifer quality in their essential fatty acid content and in order to meet requirements of marine fish larvae.

**Key-words :** Rotifers, pH, lipids, fatty acids, live food organisms

## INTRODUCTION

Le rotifère *Brachionus plicatilis* est depuis 1969 (Hirano) une proie vivante très utilisée pour alimenter les stades larvaires de poissons marins (loup, daurade, turbot). En effet, la commodité de son élevage (petite taille, taux de reproduction élevé, résistance à des conditions de température et de salinité très variables) en fait un aliment de choix durant les premiers jours de vie des larves de poissons marins (Watanabe *et al.*, 1983a). Mais la valeur nutritive des rotifères est variable et influe fortement sur la réussite des élevages de poissons. Celle-ci est surtout reliée à la composition biochimique et notamment la teneur en Acides Gras Longs Polyinsaturés (A.G.L.P.I.) n-3 des proies, essentiels pour les poissons marins (Watanabe *et al.*, 1979 ; Léger, 1980 ; Le Milinaire *et al.*, 1983 ; Watanabe *et al.*, 1989). La composition des aliments est un facteur prépondérant pour assurer la qualité nutritionnelle de ces proies.

Scott et Baynes (1978) ont montré l'influence des facteurs du milieu (température, lumière et salinité) sur la composition biochimique des rotifères, mais aucune étude ne concerne le rôle du pH sur cette composition et particulièrement sur les acides gras de ces organismes.

Dans une expérimentation précédente (Hamza et Robin, 1992), des rotifères cultivés avec la technique du bloom d'algues à deux pH différents présentaient des différences de composition en acides gras au niveau du taux d'insaturation et du rapport n-6/n-3. Mais ce résultat semblait surtout dû à l'influence de la composition des algues qui varie en fonction du pH du milieu (Cohen *et al.*, 1988). Pour pouvoir étudier l'influence directe du pH sur la composition en acides gras du rotifère *Brachionus plicatilis*, il est nécessaire de le nourrir avec un aliment de composition constante et indépendante des conditions de culture. La présente expérience a été conçue à cette fin. Des cultures de rotifères en semi-continu ont été menées à différents pH avec pour aliment un mélange de levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*) et une émulsion d'huile. L'huile utilisée est un mélange d'huile marine et d'huile végétale afin d'étudier une éventuelle influence du pH sur le rapport entre acides gras n-3 et n-6.

## MATERIEL ET METHODES

L'élevage des rotifères (*Brachionus plicatilis*) a été réalisé en semi-continu selon la technique décrite par Gatesoupe et Luquet (1981). Six cuves cylindrocôniques de 60 litres alimentées en eau de mer (35‰) filtrée (1µm) bullées par le fond et éclairées au néon ont été utilisées. Un inoculum initial de 20 litres de culture de rotifères a été augmenté de 30% par jour à l'aide d'eau de mer jusqu'à obtenir un volume de 60 litres. Ensuite, ¼ du volume a été renouvelé chaque jour. Lorsque la densité de la population est insuffisante (inférieure à 200/ml) le volume prélevé est tamisé, et les rotifères remis dans la cuve en renouvelant l'eau.

Deux cuves ont été maintenues à pH acide en ajustant à pH 5 (par apport d'une solution de HCl 8N). Deux autres cuves ont été maintenues à pH basique en ajustant de la même façon à pH 10 à l'aide de solutions de NaOH ou de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Néanmoins les pH des cultures se sont maintenus plus facilement proches de pH 10 que de pH 5. Dans deux cultures témoins, le pH non modifié a varié entre 7 et 8.

Les rotifères ont été alimentés avec de la levure de boulangerie et un mélange d'huile composé d'huile de foie de morue (60,8%), huile de bourrache (*Borago officinalis*) (35%), lécithine de soja (4%) et vitamine E (0,2% dl  $\alpha$  tocopherol).

Ce mélange a été distribué à raison de 182,4 mg/l (95,6%) de levure et 8,4 mg/l (4,4%) de mélange d'huile en trois repas par jour après homogénéisation et émulsification des huiles au mixer.

## Analyses biochimiques

Les rotifères ont été récoltés sur un tamis de maille 63µm, rincés à l'eau douce, égouttés puis congelés. Les échantillons ont été lyophilisés avant analyse et dupliqués. L'aliment étant mélangé au moment de la distribution, sa composition a été calculée à partir des analyses séparées de la levure et de l'huile utilisée. Chaque échantillon a été dupliqué pour les analyses.

L'extraction des lipides a été réalisée selon la méthode de Folch *et al.*, (1957) sur des échantillons de 500 mg (poids sec) en utilisant le Dichlorométhane au lieu du Chloroforme. Les acides gras (A.G.) ont été dosés sur les lipides totaux par la technique de Kates (1972) adaptée par Stephan et Lamour (comm. pers.). Les esters méthyliques d'acides gras ont été séparés en chromatographie phase gazeuse sur une colonne capillaire phase Carbowax 20M (longueur : 25m, diamètre : 0,25mm) avec un injecteur de Ross (gaz vecteur H<sub>2</sub>) en mode isotherme à 172°C (la température de l'injecteur et du détecteur est de 200°C).

## Statistiques

Le test de Mc Intyre *et al.*, (1969) a été utilisé. Il permet d'évaluer la distance qui existe entre la composition en acides gras de deux mesures, de deux répliquats (échantillons d'un même traitement), et entre deux échantillons (traitements différents).

La valeur de D ou coefficient de distance s'exprime ainsi :

$$D_{jh} = [\text{Som } (P_{ij} - P_{ih})^2]^{1/2}$$

Avec D<sub>jh</sub> : degré de différence entre les espèces j et h

P<sub>ij</sub> : pourcentage du total d'A.G. de l'A.G. i dans l'échantillon j

P<sub>ih</sub> : pourcentage du total d'A.G. de l'A.G. i dans l'échantillon h

## RESULTATS

Les densités initiales de rotifères sont comprises entre 230 et 280 individus/ml selon les cuves (tableau I). Aux pH acide et basique les populations les plus importantes sont observées avec des densités de plus de 300/ml, valeurs jamais atteintes à pH neutre. Avec ce traitement témoin, des chutes de population ont été observées. Ces cuves ont été récoltées une seule fois pour ne pas faire diminuer des densités déjà faibles.

**Tableau I-** Evolution journalière des densités (nombre/ml) des rotifères au cours du temps et à différents pH de culture

pH	Cuves	Jours										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Acide (5-6)	1	200	242	278	150	192	200	220	330*	258	190*	164
	2	200	278	158	130	164	232	280	340*	292	262*	256
Témoin (7-8)	3	200	240	198	190	216	200	212	224*	164	118	30
	4	200	228	252	206	158	202	240	250*	132	132	124
Basique (9-10)	5	200	238	210	190	140	184	200	310*	218	150	206
	6	200	240	218	190	152	150	218	214*	196	164	204
Volume (litres)		26	34	44	58	60	60	60	60	60	60	60

\*: Prélèvements effectués

pH acide ou basique, c'est aussi la seule série que l'on retrouve en quantité plus importante dans les rotifères que dans l'aliment.

Les A.G. n-6 totaux sont très comparables aux différents pH. Il y a toutefois quelques différences de répartition avec notamment plus de C18:3n-6 et de C20:4n-6 à pH acide, mais le total des Acides Gras Longs Polyinsaturés (AGLPI) de cette série ne varie pratiquement pas avec le traitement, avec une présence notable de C20:3n-6, acide gras non présent dans l'aliment.

La série des A.G. n-3 semble être plus influencée par le facteur pH : la teneur en ces A.G. est plus faible à pH neutre, plus élevée à pH acide et maximale à pH basique. Les variations concernent surtout les AGLPI n-3 : C20:5, C22:5 et C22:6. Leurs valeurs sont toujours plus importantes à pH 9-10 (% A.G. totaux et % M.S.).

La différence la plus remarquable concerne le C22:6 dont la teneur est trois fois plus importante à pH basique qu'à pH neutre, le pH acide étant intermédiaire.

**Tableau IV**- Valeurs du coefficient de distance (D) entre deux mesures, deux répliquats et deux échantillons

D mesures	B1	B2	B3	B4	B5	B6
	1,1	1,1	3,3	0,0	0,4	0,0
D répliquats	B1B2		B3B4		B5B6	
	4,2		3,9		2,0	
D échantillons	B1B3	B1B4	B2B3	B2B4		
	4,9	3,6	8,8	7,3		
	B1B5	B1B6	B2B5	B2B6		
	4,5	6,0	2,1	2,8		
	B3B5	B3B6	B4B5	B4B6		
	8,8	10,5	7,2	8,6		

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Les densités de rotifères les plus fortes sont atteintes à pH acide et basique et les mortalités surviennent à pH neutre. Les productions de rotifères sont généralement très variables, et on ne peut conclure sur la base de cette seule expérience à un effet du pH sur le développement des populations de *Brachionus plicatilis*. Les productions obtenues dans ces élevages expérimentaux ont été plus faibles que dans nos productions de routine, pratiquées avec la même technique, sans ajuster le pH. Le type de bac utilisé pour cette expérience semble généralement donner de moins bonnes productions que les élevages de routine effectués en plus grands volumes. Hettiarachchi *et al.*, (1995) constatent que le pH n'a pas d'effet sur la densité et la croissance des populations de *Brachionus calyciflorus* (rotifère d'eau douce). Par contre, la température et la salinité semblent influencer sur le développement des rotifères. Glavic *et al.*, (2000) obtiennent des densités maximales de *Brachionus plicatilis* à une température de 22°C et une salinité de 20‰.

L'effet des facteurs du milieu sur la composition biochimique des rotifères a été étudié par Scott et Baynes (1978). Ainsi, en alimentant *Brachionus plicatilis* par trois espèces d'algues, ces auteurs montrent l'influence de la température, de la nourriture et du jeûne sur la teneur en lipides de ce rotifère. De même Olsen *et al.*, (1993) constatent qu'après un jeûne de plus de 5 jours, les rotifères subissent une perte de leur teneur en lipides qui devient plus rapide avec l'augmentation

de la température. Dans la présente expérience, le taux d'alimentation est constant en fonction du volume et donc l'aliment disponible par rotifère dépend de la densité, on remarque que cette disponibilité n'entraîne pas de plus forte teneur en lipides. Par contre le taux de lipides semble plutôt dépendre de la productivité des cultures (Vadstein et Olsen, 1994).

Le pH ne semble donc pas avoir une influence directe sur le taux de lipides de *Brachionus* mais plutôt sur les acides gras qui le composent. Son effet est observé principalement sur les acides gras de la série n-3, et surtout les Acides Gras Longs Polyinsaturés (AGLPI) de cette série. Ces différences sont compensées par les acides gras monoinsaturés de la série n-7 dont le taux diminue quand celui des acides gras n-3 augmente. La présence notable du C20:3n-6 semble issue de l'élongation du C18:3n-6 apporté par l'huile de bourrache, déjà décrite par Robin (1994).

Ces résultats sont à comparer à ceux de Hamza et Robin (1992). En rajoutant du CO<sub>2</sub> à l'air (ce qui donne un pH entre 7 et 8) dans des cultures d'algues, on a pu obtenir chez les rotifères qui les ingéraient des quantités d'acides gras n-3 et de lipides très supérieures à celles obtenues sans apport de CO<sub>2</sub> (pH 9 à 10). Mais ceci était induit par la composition des algues influencée par ces deux traitements. Il en est de même pour la proportion des séries n-6/n-3 particulièrement influencée par les conditions du milieu des algues (Cohen *et al.*, 1988). Par contre, il y avait, comme dans la présente étude, une plus forte proportion d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne à pH basique (en fonction des acides gras totaux), ceci pourrait traduire une adaptation des organismes vis à vis du pH, déjà suggéré par les travaux de Bolis *et al.*, (1984) sur la truite et comparable à l'effet plus connu de la température ou de la salinité chez les poissons (Bell *et al.*, 1986).

En Tunisie, la seule étude concernant l'effet des facteurs du milieu sur les lipides des organismes marins porte sur l'effet de la salinité sur le métabolisme lipidique du muge (Cafsi, *sous presse*).

Etant donné le rôle des rotifères dans l'alimentation des premiers stades larvaires de poissons, l'intérêt est souvent porté sur leur valeur nutritive. La définition du besoin en A.G. essentiels (AGLPI n-3) par plusieurs auteurs (Watanabe *et al.*, 1979 ; 1983b ; Léger, 1980) a fait juger de la valeur nutritive des rotifères par leur teneur en ces acides gras. Leur déficience peut entraîner une mauvaise croissance ou des mortalités (Watanabe *et al.*, 1979). Le Milinaire *et al.*, (1983) considèrent que pour nourrir correctement les larves de turbot, les rotifères doivent contenir au moins 1,3% de matière sèche en AGLPI.

Izquierdo *et al.*, (1989) trouvent qu'une quantité d'AGLPI n-3 de 3% de la matière sèche des rotifères permet d'obtenir une croissance et une survie optimale des larves de dorade (*Pagrus major*). De ce fait, des enrichissements peuvent être réalisés soit en les nourrissant d'algues riches en AGLPI n-3 telles que *Isochrysis galbana* (Takeyama *et al.*, 1996) soit par utilisation d'enrichissement tels que le Selco, riche en EPA et DHA, (Fernandez-Reiriz *et al.*, 1993).

Ici, le pH basique nous permet d'atteindre des taux 2 à 3 fois plus élevé qu'à pH neutre. La différence relative la plus importante concerne l'acide docosahexaénoïque DHA (C22:6n-3) surtout à pH basique. Cet acide gras est considéré comme plus efficace en tant qu'acide gras essentiel que l'acide eicosapentaénoïque EPA (C20:5n-3) (Watanabe *et al.*, 1989).

Des cultures de rotifères à pH acide ont déjà été utilisées en vue d'influencer la microflore bactérienne (Gatesoupe, 1990), ce qui permettait d'obtenir un impact sur la survie des larves de turbot (*Scophthalmus maximus*). Il est possible que l'effet du pH sur les acides gras des rotifères ait participé aux résultats obtenus par cet auteur.

Si on considère la valeur essentielle qu'ont certains acides gras longs de la série n-3, il est important de remarquer qu'on peut améliorer leurs teneurs en intervenant sur le pH du milieu de

culture. Ceci peut permettre de renforcer la qualité nutritive des proies vivantes en vue de l'alimentation des larves de poissons.

## BIBLIOGRAPHIE

- BELL, M.V., HENDERSON R.J., SARGENT J.R., 1986- The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83B : 711-719.
- BOLIS, C.L., CANBRIA A., FATMA M., 1984- Effects of acid stress on fish gills In : Toxines, drugs, pollutants in marine animals, L. Bolis, J.A. Zadunaisky, R. Gillis eds. Springer, Berlin : 122-129.
- CAFSI M., - Effets de la basse salinité du milieu sur le métabolisme lipidique du muge. *Thèse de Doctorat d'Etat, Fac. Sciences Tunis. (sous presse)*
- COHEN Z., VONSHAK A., RICHMOND A., 1988- Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red algae *Porphyridium cruentum* correlation to growth rate. *J. Phycol.*, 24 : 328-332.
- FERNANDEZ-REIRIZ M.J., LABARTA U., FERREIRO M.J., 1993- Effects of commercial enrichment diets on the nutritional value of the rotifer (*Brachionus plicatilis*), *Aquaculture*, 112 : 195-206.
- FOLCH J., LEES M., STANLEY S.H.G., 1957- A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226 : 497-509.
- GATESOUBE F.J., LUQUET P., 1981- Practical diet for mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* : application to larval rearing of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 22: 149-163.
- GATESOUBE F.J., 1990- The continuous feeding of Turbot larvae *Scophthalmus maximus* and control of the bacterial environment of rotifers. *Aquaculture*, 89 : 139-148.
- GLAVIC N., KOZUL V., SKARAMUKA B., GLAMUZINA B., LUCIC D., TUTMAN P., - The synergetic effect of temperature and salinity on rotifer *Brachionus plicatilis* population growth and lorica size in mass rearing. *Acta Adriat.*, 41 (2) (sous presse).
- HAMZA N., ET ROBIN J.H., 1992- Influence du CO<sub>2</sub>/pH sur la composition biochimique des algues et des rotifères. *Océanis*, 18 (2) : 185-188.
- HETTIARACHCHI DC., HETTIARACHCHI M., CHEONG CH., 1995- The population structure and the effect of pH on growth characteristics of *Brachionus calyciflorus amphiceros* grown on freshwater *Chlorella sp.*, *J. Natl. Conc. Sri Lanka*, 23 (4) : 143-151.
- HIRANO R., 1969- Rearing of black sea bream larvae. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, 35 : 567-569
- IZQUIERDO M.S., WATANABE T., TAKEUSHI T., ARAKAWA T., KITAJIMA C., 1989- Requirement of larval red sea bream *Pagrus major* for essential fatty acids. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 859-867.
- KATES M., 1972- Technique of lipodology in : *Laboratory techniques in Biochemistry and molecular biology edited by : T.S. Work and E. Work. North Holland Publishing Company. Amsterdam : 610 p.*
- LEGER C., 1980- Développements récents de la notion d'acides gras essentiels chez les poissons. *Ann. Nutr. Alim.*, 34 : 207-216.
- LE MILINAIRE C., GATESOUBE F.J., STEPHAN G., 1981- Composition en acides gras du rotifère *Brachionus plicatilis* nourri avec différents aliments composés : influence sur la croissance et la teneur en acides gras essentiels de la larve de turbot (*S. maximus*). *Publi CNEXO (Actes Colloq.)*, 14, 275-290.
- LE MILINAIRE C., GATESOUBE F.J., STEPHAN G., 1983- Approche du besoin quantitatif en AGLPI de la série n-3 chez la larve de turbot (*S. maximus*) *C.R. Acad. Sc. Paris*, 296 : 916-920.
- MAC INTYRE C.D. ET AL., 1969- Fatty acids in lotic periphyton: another measure of community structure. *J. Phycol.*, 5 : 26-32.
- OLSEN Y., REITAN KI., VADSTEIN O., 1993- Dependence of temperature on loss rate of rotifers, lipids, and omega 3 fatty acids in starved *Brachionus plicatilis* cultures. *Rotifer Symposium VI in Hydrobiologia*, vol. 255-256 : 13-20
- VADSTEIN O., OLSEN Y., 1994- Effect of growth rate and composition of food on C, N, and P, content and element ratios of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *VII International Rotifer Symposium 6-10 June 1994 Mikolajki (Poland)*.

- ROBIN J.H., 1994- Elongation and desaturation of n-6 fatty acids by the rotifer *Brachionus plicatilis*. VII *International Rotifer Symposium. 6-10 June 1994 Mikolajki (Poland)*.
- SCOTT P.A., BAYNES M.S., 1978- Effect of algal diet and temperature on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 14 : 247-260.
- TAKEYAMA H., IWAMOTO K., HATA S., TAKANO H., MATSUNAGA T., 1996- DHA enrichment of rotifers : A simple two-step culture using the unicellular algae *Chlorella regularis* and *Isochrysis galbana*. *J. Mar. Biotechnol*, vol.3 : 244-247.
- WATANABE T., OOWA F., KITAJIMA C., FUJITA S., YONE Y., 1979- Relationship between the dietary value of rotifers *B. plicatilis* and their content of n-3 Highly Unsaturated Fatty Acids. *Bull. Jap. Soc. Sc. Fish.*, 45 : 883-889.
- WATANABE T., KITAJIMA C., FUJITA S., 1983a- Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation in fish : a review. *Aquaculture*, 34 : 115-143.
- WATANABE T. TAMIYA T., OKA A., HIRATA M., KITAJIMA C., FUJITA S., 1983b- Improvement of dietary value of live foods for fish larvae by feeding them on n-3 HUFA and fat soluble vitamin. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, 49 : 471-479
- WATANABE T., IZQUIERDO S.M., TAKEUCHI T., SATOH S., KITAJIMA C., 1989- Comparison between E.P.A. and D.H.A. in terms of essential fatty acids efficacy in larval red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55 : 1635-1640