

Ecole Nationale  
Vétérinaire de Nantes

Unité d'aquaculture et de  
pathologie aquacole

atlanpôle – la chantrerie  
44307 Nantes cedex 3

Aquarium du Musée  
national des Arts  
d'Afrique et d'Océanie

293 av. Daumesnil  
75012 Paris

# Hydrogent<sup>®</sup> :

## Une nouvelle thérapie pour l'aquariologie ?

**COTTARD LOIC**

Rapport de stage

Diplôme d'école : Aquaculture, pathologie aquacole et environnement.

Promotion 2001 / 2002

Avant d'entamer ce rapport, je souhaiterais remercier toutes les personnes sans lesquelles, cette étude n'aurait jamais pu être réalisée :

- ✓ Monsieur Hignette.
- ✓ Toute l'équipe des soigneurs (Deodat, Thierry, Jean-Daniel, Stéphane, Sylvain, Laurent et Nicolas), leur précieuse aide et leur bonne humeur.
- ✓ Monsieur Halberstam, pour l'hydrogent® et toutes les informations concernant le produit.
- ✓ Messieurs Maisonneuve et Bolot, pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ces travaux.
- ✓ Monsieur Couchou-Meillot - avec qui je partage la passion de rechercher les "petites bêtes" sur les poissons - et Monsieur Monnier, pour leurs envois de sujets à étudier.
- ✓ Monsieur Barthélémy, pour m'avoir ouvert les portes d'Océanopolis et m'avoir confié des coraux.

# Sommaire

<b>75012 PARIS.....</b>	<b>1</b>
RÉSUMÉ.....	5
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>6</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODE .....</b>	<b>9</b>
<b>1. CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU PRODUIT .....</b>	<b>10</b>
<b>2. TECHNIQUES DE DOSAGE .....</b>	<b>11</b>
DOSAGE DE L'ACIDE PERACÉTIQUE.....	11
DOSAGE DE L'EAU OXYGÉNÉE.....	11
Dosage par spectrophotométrie.....	11
Dosage par colorimétrie.....	11
Dosage par bandelettes colorées .....	12
<b>3. MATÉRIEL AQUARIOLOGIQUE.....</b>	<b>12</b>
<b>4. ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DE DÉCOMPOSITION DE L'HYDROGENT® .....</b>	<b>13</b>
INFLUENCE DES DIFFÉRENTES QUALITÉS D'EAU .....	13
INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE.....	13
INFLUENCE DES MATÉRIAUX DE FILTRATION.....	13
ÉTUDE DE CAS CONCRETS EN BAC DE PRÉSENTATION AU PUBLIC.....	13
<b>5. ÉTUDE ATPMÉTRIQUE DES EFFETS DE L'HYDROGENT®.....</b>	<b>14</b>
PRINCIPE.....	14
PRÉCAUTIONS À PRENDRE CONCERNANT LA LECTURE DES VALEURS D'ATP.....	14
PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.....	14
<b>6. EFFETS DU PRODUIT SUR LA FILTRATION BIOLOGIQUE.....</b>	<b>15</b>
<b>7. TOXICITÉ.....</b>	<b>15</b>
<b>8. DÉTERMINATION DU POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE DE L'HYDROGENT®.....</b>	<b>16</b>
FACE À DES AGENTS PATHOGÈNES.....	16
Expériences portant sur un Gyrodactylidae.....	16
Expériences portant sur un Dactylogyridae.....	16
Expériences portant sur un autre Plathelminthes : Benedenia sp.....	16
FACE À DES AGENTS NON PATHOGÈNES .....	17
Le cas des planaires en bacs récifaux.....	17
TRAITEMENTS STATISTIQUES DES DONNÉES.....	17
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>18</b>
<b>1. CHOIX DES TECHNIQUES DE DOSAGE ADAPTÉES.....</b>	<b>19</b>
REPRÉSENTATIVITÉ DU DOSAGE.....	20
<b>2. CINÉTIQUE DE DÉCOMPOSITION DE L'HYDROGENT®.....</b>	<b>21</b>
INFLUENCE DES COMPOSANTES ENVIRONNEMENTALES.....	21
INFLUENCE DE LA FILTRATION.....	22
PRÉSENTATION DE DEUX CAS CONCRETS.....	23
<b>3. ÉTUDE ATPMÉTRIQUE.....</b>	<b>24</b>
<b>4. INFLUENCE DU PRODUIT SUR LA DÉCROISSANCE DES NITRITES.....</b>	<b>25</b>
<b>5. ÉVALUATION DES SEUILS DE TOXICITÉ.....</b>	<b>26</b>
<b>6. ÉVALUATION DU POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE.....</b>	<b>27</b>

EXPÉRIENCES MENÉES SUR <i>GYRODACTYLUS</i> SP.....	27
EXPÉRIENCES MENÉES SUR <i>DACTYLOGYRUS</i> SP.....	27
EXPÉRIENCES MENÉES SUR <i>BENEDENIA</i> SP.....	28
EXPÉRIENCES MENÉES SUR DES PLANAIRES EN BACS RÉCIFAUX.....	29
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>30</b>
<b>1. RÉOLUTION DU PROBLÈME DE DOSAGE.....</b>	<b>31</b>
<b>2. COMPORTEMENT ET INFLUENCE DU PRODUIT EN MILIEU AQUEUX.....</b>	<b>31</b>
<b>3. L'HYDROGENT® COMME OUTIL DE DÉSINFECTION.....</b>	<b>32</b>
EFFET DU PRODUIT SUR LES FILTRES BIOLOGIQUE .....	33
<b>4. TOXICITÉ.....</b>	<b>33</b>
MODES DE TRAITEMENT ET RISQUES ASSOCIÉS.....	33
Traitement par addition directe du produit dans les bacs.....	33
Traitement par balnéation.....	34
<b>5. L'HYDROGENT® COMME OUTIL THÉRAPEUTIQUE.....</b>	<b>35</b>
EFFICACITÉ DU PRODUIT SUR LES PLATHELMINTHES PATHOGÈNES.....	35
<i>Gyrodactylus</i> sp.....	35
<i>Dactylogyrus</i> sp.....	35
<i>Benedenia</i> sp.....	36
EFFICACITÉ DU PRODUIT SUR DES ANIMAUX NON PATHOGÈNES.....	36
Élimination des planaires dans les bacs récifaux.....	36
Élimination des <i>Aiptasia</i> sp.....	36
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>37</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>39</b>

## Résumé

L'hydrogent<sup>®</sup> est un mélange stabilisé d'acide peracétique et de peroxyde d'hydrogène. Il pourrait s'agir d'un traitement efficace contre les pathologies rencontrées en aquarium. Son dosage, par colorimétrie ou spectrophotométrie, peut être mis en place de manière simple et efficace. Ces techniques ont montré que la vitesse de dégradation du produit en milieu aqueux est soumise à la minéralisation, la salinité, la température et la présence de matière organique. Le potentiel de désinfection des deux oxydants, étudié par ATPmétrie, n'est pas négligeable. L'utilisation thérapeutique peut se faire soit par injection du produit directement dans la cuve à traiter (à 5 ou 10 mg/l) ou par des bains rapides à forte concentration (10 minutes à 50 mg/l, 5 minutes à 100 mg/l ou 2,5 minutes à 200 mg/l). Dans tous ces cas de figure, le taux de survie des animaux est extrêmement élevé. Le traitement permet de détruire l'ensemble des microorganismes : bactéries, champignons, algues et virus, ainsi que les ectoparasites de type Plathelminthes.

Mots clés : Hydrogent<sup>®</sup>, peroxyde d'hydrogène, acide peracétique, ATPmétrie, désinfection, pathologie, aquariologie.

# introduction

Dans le cadre actuel de la législation européenne, les outils thérapeutiques se font de moins en moins nombreux. La disparition des produits tels que le Neguvon ou le formol-vert malachite laisse l'aquaculture et l'aquariologie face à un problème délicat. En effet, les solutions alternatives à l'utilisation de ces moyens de lutte se font rares voire inexistantes. Les professionnels se voient contraints de faire usage de produits illégaux -de plus en plus difficiles à se procurer et néfastes pour l'environnement- ou de faire une utilisation, parfois hasardeuse, de molécules n'étant pas destinées à la pisciculture. Il apparaît donc important de chercher à développer de nouveaux produits associés à de nouvelles thérapies. C'est dans cet esprit qu'ont commencé les expériences portant sur l'eau oxygénée, au sein de l'aquarium du Musée National des Arts d'Afrique et d'Océanie (M.A.A.O.).

Cela fait maintenant plusieurs années que son directeur, l'équipe de soigneurs et différents stagiaires se sont penchés sur l'utilisation des oxydants. Les premiers essais ont portés sur l'eau oxygénée, apportée par le liquogène des oxydators puis par le produit d'une société : ECOBIO 1000®. Cette société a, par la suite, proposé une nouvelle solution : l'Hydrogent®. Ce dernier est un mélange de peroxyde d'hydrogène et d'acide peracétique.

Ces deux composés sont connus depuis plusieurs années en qualité de désinfectants (Stampi et al. 2001, Lambert et al. 1999, Bonadonna et al. 1999). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est déjà citée comme étant un outils thérapeutique efficace dans de nombreux articles concernant des pathologies aquacoles (Treasurer et grant 1997, Mischke et al. 2001, Montgomery-Brock et al. 2001, Speare et Arsenault 1997, Lumdsen et al. 1998, Fitzpatrick et al. 1995). Mais en ce qui concerne l'acide peracétique, les publications faisant état d'un usage potentiel en aquaculture sont rares. Elles semblent actuellement se limiter à trois références : l'article de Rahkonen et Koski (2002) évoquant son usage éventuel face à la maladie des points blancs, celui de Madsen et al. (2000) décrivant un cas concret de lutte contre une parasitose et celui du laboratoire vétérinaire d'Arhus, au Danemark (1999) à propos de son action contre les virus.

Or tous ces articles font référence au domaine de la pisciculture et plus précisément de la pisciculture en eau froide. Bien que le but soit le même dans un aquarium public, à savoir la destruction des agents pathogènes, les conditions sont quelques peu différentes. La température de l'eau est bien plus élevée, la circulation de l'eau se fait sur circuit fermé, les bacs sont pourvus de décors ainsi que de végétation et enfin, la densité en poissons est moindre et la survie individuelle de certains spécimens est très importante.

Forts de l'existence de ces contraintes et des travaux déjà réalisés, nous avons commencé les manipulations. Les expériences menées s'orientent sur trois axes différents : le comportement du produit en milieu aqueux, son potentiel de désinfection et son potentiel vétérinaire. La première partie consistera à évaluer comment la concentration des deux oxydants évolue au cours du temps. Nous chercherons à comprendre quels sont les principaux facteurs influant leur dégradation. La seconde partie sera l'occasion de tester leurs capacités à assainir un milieu contaminé : le produit est-il capable de détruire des microorganismes potentiellement dangereux? Cette évaluation sera mise en place grâce à l'ATPmétrie. Enfin, la dernière partie s'orientera vers le traitement de pathologies clairement identifiées. Nous y chercherons le meilleur protocole de traitement, celui qui permettra de venir à bout des pathogènes sans mettre en jeu la vie des animaux.

Pour finir, nous discuterons et conclurons sur le potentiel thérapeutique de l'Hydrogent<sup>®</sup> ; c'est à dire sa capacité à améliorer les conditions de vie et les chances de survie des animaux face à un élément pathogène.

# Matériel et méthode

# 1. Caractéristiques physico-chimiques du produit

## Données du fournisseur :

Forme : liquide

Odeur : légère mais perceptible (rappelant celle du vinaigre)

pH : 1.2 à 1.3

Couleur : incolore

Stabilité : 3 ans

Réactivité : comburant en présence de matériaux organiques (bois, coton, papier, cuir,...)

Précautions d'emploi : manipuler avec des gants et éviter tout contact avec les muqueuses

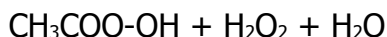
Informations écologiques : biodégradable à 90 %, sans danger pour l'environnement à l'état dilué.

## Composition :

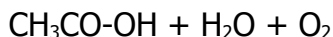
L'Hydrogent<sup>®</sup> est un mélange d'eau extra pure (59.5%), d'acide acétique (25.5%) et de peroxyde d'hydrogène (15%).



L'eau oxygénée, apportée en excès, et l'acide acétique réagissent ensemble pour former de l'acide peracétique. Le produit se stabilise sous la forme :



La décomposition de l'Hydrogent<sup>®</sup> se caractérise par la libération d'oxygènes libres (ou oxygènes singulets). Ces derniers vont oxyder la matière organique présente dans le milieu ou bien vont se recombiner pour former du dioxygène. Une fois la réaction achevée, il ne reste plus que :



Il faut noter que c'est ce pouvoir oxydant qui confère au mélange son potentiel biocide. En effet, l'oxygène libre va agir comme perturbateur de l'équilibre de la double membrane phospholipidique des cellules vivantes.

## 2. Techniques de dosage

### Dosage de l'acide peracétique

A l'heure actuelle, en France, il existe une seule technique facile d'utilisation, capable de doser la concentration en acide peracétique et dont l'efficacité a été validée. Il s'agit d'une bandelette commercialisée par les laboratoires VWR international : Merckoquant® 1.10084. Elle s'utilise en réalisant un simple trempage d'une seconde de la bandelette. Après cinq secondes, il est possible de lire la concentration de l'acide en se référant à une échelle de couleur. Cette dernière étant comprise entre 0 et 50 mg/l et comprenant six échelons (0/5/10/20/30/50). Le milieu hospitalier a recours à cette technique, afin de déterminer la durée des bains de désinfection des sondes d'endoscopie.

### Dosage de l'eau oxygénée

#### Dosage par spectrophotométrie

Relativement simple et rapide, cette technique est commercialisée également par la société VWR international, sous l'appellation spectroquant® 1.14731.0001. Elle consiste à prélever un échantillon de 10 ml de solution à doser et à l'introduire dans un tube de test. La réaction colorimétrique est basée sur un ester de titane entraînant une coloration jaunâtre. Après trois minutes, le tube sera introduit dans un spectrophotomètre qui permettra de visualiser la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (cette lecture devra être faite dans les vingt minutes suivants la réaction). Le système permet de dosage précis à 0.1 mg/l dans une gamme comprise entre 2 et 20 mg/l.

#### Dosage par colorimétrie

Il s'agit de la technique décrite par Cuer (1986) sous l'appellation "méthode manganométrique". Elle est basée sur l'utilisation du permanganate de potassium pour doser la concentration en peroxyde d'hydrogène d'une solution après avoir acidifié cette dernière par de l'acide sulfurique concentrée. La solution de KMnO<sub>4</sub> est versée progressivement dans l'échantillon, à l'aide d'une burette graduée, jusqu'au changement permanent de coloration. Le liquide devient rose. Le titre exact de la solution en g/l s'obtient alors par la formule :

$$\frac{17 n t}{v}$$

avec  $\left\{ \begin{array}{l} n : \text{le nombre de ml de KMnO}_4 \text{ versés ;} \\ t : \text{le titre exact de la solution de KMnO}_4 \text{ en normalité ;} \\ v : \text{le volume de la prise d'essai en ml.} \end{array} \right.$

Le choix du volume de la prise d'essai a été arrêté à 100 ml. On y ajoute 1 ml d'acide sulfurique à 2 N et on dose par une solution de permanganate de potassium à 0.005 N. Mais les volumes et les titres sont adaptables à des gammes de concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus élevées.

### Dosage par bandelettes colorées

Cette technique est commercialisée par SANOSIL. Par un simple trempage de deux secondes, on obtient la concentration en mg/l de peroxyde d'hydrogène en se référant à une échelle colorimétrique graduée en 1/5/10/20/50/100 et 200.

## **3. Matériel aquariologique**

L'ensemble des expériences est réalisé au sein des 14 bacs d'expérimentation de l'aquarium. Chacun de ces bacs (d'environ 150l) étant équipé soit d'une pompe de brassage, destinée à maintenir un mouvement d'eau constant ; soit d'un système de filtration, immergé dans l'eau et comprenant une pompe de circulation. Les filtres sont formés de trois couches : une couche de ouate synthétique (ou perlon), une couche de matériaux support pour filtre biologique et une seconde couche de perlon. Tous les bacs contenant des animaux vivants sont soumis à une aération continue grâce à un diffuseur d'air comprimé. Les poissons sont systématiquement maintenus à jeun durant toute la durée des manipulations.

Afin d'assurer l'efficacité des processus biologiques, les matériaux de filtration sont prélevés au sein des filtres desservant des bacs d'exposition. Entre chaque manipulation, les aquariums sont désinfectés à l'eau de javel et rincés deux fois de suite. Les masses filtrantes sont systématiquement renouvelées.

## 4. Etude de la cinétique de décomposition de l'Hydrogent®

Afin de mieux appréhender les durées efficaces de traitement du produit, il est important de pouvoir évaluer sa décroissance dans le temps.

### Influence des différentes qualités d'eau

Dans une série de cinq bacs, contenant un volume d'eau d'environ 100 l soumis à un brassage permanent, est introduit une dose d'Hydrogent® suffisante pour obtenir une concentration de 10 mg/l d'oxydants, soit 2.8 ml de produit. Cette série présente de l'eau osmosée, de l'eau du circuit général d'alimentation de l'aquarium (dureté : TH = 20), de l'eau saumâtre (11 ‰), de l'eau salée (25 ‰) et de l'eau du circuit additionnée de 5 g de broyat de merlan. La température du liquide est de 25°C.

Le but est d'évaluer la décroissance du produit en fonction de différents facteurs. La concentration en oxydants est donc mesurée régulièrement au cours du temps.

### Influence de la température

Une nouvelles série de quatre bacs équipés de brasseurs est mise en place. On y retrouve les mêmes qualités d'eau : osmosée, du circuit, saumâtre et salée. Cependant, une résistance chauffante est ajoutée afin de maintenir le liquide aux environs de 30°C.

Un suivi du taux d'oxydant est mis en place de la même manière que dans l'expérimentation précédente.

### Influence des matériaux de filtration

On reprend la manipulation en utilisant des filtres plongés dans le liquide à la place des brasseurs. Ces pompes sont chargés en divers matériaux de filtration : pouzzolane, zéolithe et maërl. Un témoin est établi par une pompe exempte de filtre biologique, son rôle se limitera donc à un brassage de la masse d'eau. Dans tous les cas, la température est de 25 °C.

Une fois de plus, le taux d'oxydants est suivi au cours du temps.

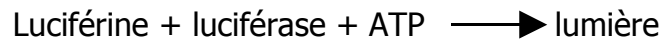
### Etude de cas concrets en bac de présentation au public

Cette expérimentation porte sur deux bacs de 8000 l de configuration semblable. Le premier, en eau de mer (27°C pour une salinité de 40‰), abrite une dizaine de carangues royales (*Gnathanodon speciosus*). Il sera traité aux environs de 30 mg/l d'oxydants. Le second, en eau douce (28°C), contient différents Cichlidés et sera amené à recevoir environ 10 mg/l d'oxydants. Dans les deux cas, le système de filtration est supprimé, seul persistent les pompes de recirculation de l'eau. L'évolution de la concentration du produit sera régulièrement suivie dans le temps.

## 5. Etude ATPmétrique des effets de l'Hydrogent<sup>®</sup>

### Principe

Cette technologie repose sur la présence d'ATP au sein de toutes les cellules vivantes. Elle consiste à faire réagir de la luciférine avec cette source d'énergie.



Les réactifs sont contenus dans un "stylo". Ce dernier sera immergé durant une seconde dans la solution à évaluer. Ce laps de temps suffit pour que l'eau éventuellement chargée en microorganismes pénètre l'enceinte stérile par capillarité. Puis le mélange s'effectue mécaniquement par agitation. Il suffit d'évaluer la quantité de lumière émise, en URL (unité relative de lumière), grâce à un luminomètre, pour connaître le taux de contamination d'un milieu. L'ensemble de ces produits est commercialisé par les laboratoires VWR international, sous l'appellation : HY-LITE 2<sup>®</sup>.

### Précautions à prendre concernant la lecture des valeurs d'ATP

L'image de la contamination donnée par cet appareillage ne permet de définir ni la nature de la contamination (type de bactérie, de levure ou autres) ni de préciser une quelconque quantité d'éléments contaminants. En effet, la quantité moyenne d'ATP par cellule peut varier de  $0,1 \cdot 10^{-15} \text{g}$  pour *Escherechia coli* à  $800 \cdot 10^{-15} \text{g}$  pour une levure de bière (Champiat et Larpent, 1993). Il s'agit donc bien de garder à l'esprit que les résultats offrent une image globale du niveau de propreté du milieu. Ils ne pourront donc être traduits qu'en terme de substrat plus ou moins contaminé ou plus ou moins bien désinfecté.

### Protocole expérimental

Au sein même de trois bacs de 90 l, soumis à un brassage continu, nous avons introduit un broyat de masse viscérale de merlan d'environ 4 g. Une fois les différents milieux contaminés à des niveaux similaires, nous avons ajouté différentes doses d'Hydrogent<sup>®</sup> et suivi l'évolution de l'ATP dans le temps.

## 6. Effets du produit sur la filtration biologique

Une part importante de la filtration s'effectue grâce aux bactéries entrant dans le cycle de l'azote. Afin de connaître l'influence de l'Hydrogent<sup>®</sup> sur ces micro-organismes, nous avons mené l'expérience suivante :

Deux bacs de 100 l d'eau du circuit d'alimentation, maintenus à 25°C et brassés en permanence, sont enrichis en nitrites à hauteur de 1 mg/l. Cet enrichissement se fait par addition de nitrite de sodium. Le premier aquarium est soumis aux conditions naturelles, tandis que le second reçoit en plus une dose de traitement équivalant à 10 mg/l d'oxydants.

L'évolution du taux de  $\text{NO}_2^-$  est suivie au cours du temps. Pour se faire, nous avons eu recours à la spectrophotométrie, via le kit spectroquant<sup>®</sup> commercialisé par les laboratoires VWR international.

## 7. Toxicité

A partir des travaux réalisés par les stagiaires précédents (Bordat 2000, Chentrier 1999) nous avons pu délimiter plusieurs concentrations létales d'oxydants. Ces résultats ont été approfondis en testant les limites de résistance des poissons.

Pour ces tests, il a été choisi une espèce d'eau douce, tropicale, relativement résistante et de petite taille : *Tanichtys albonubes*. Les animaux sont répartis en treize lots de trente individus. Chaque lot sera installé dans un bac de 100 l équipé d'une pompe de filtration. Le traitement se fera par addition directe du produit dans les bacs pour les concentrations de 5, 10 et 20 mg/l d'oxydants. Pour des doses supérieures d'Hydrogent<sup>®</sup>, les poissons seront baignés préalablement dans des seaux de 10 l contenant la quantité suffisante de produit traitant pour atteindre 25, 50, 100 et 200 mg/l d'oxydants. Chaque bain sera testé sur différents laps de temps; le but de la manipulation étant d'approcher les combinaisons limites : concentration / durée du traitement.

Chaque jour et durant 96 heures, les individus morts sont retirés des bacs et autopsiés. Au bout des quatre jours, on effectue un décompte des survivants.

## 8. Détermination du potentiel thérapeutique de l'Hydrogent®

### Face à des agents pathogènes

#### Expériences portant sur un Gyrodactylidae

Un lot de cent soixante six guppies (*Poecilia reticulata*) est mis en contact avec le parasite *Gyrodactylus sp.* durant 72 heures. Passé ce délai, ils sont répartis en cinq lots : un témoin, trois bacs traités par addition direct d'Hydrogent® (à 5, 10 et 20 mg/l d'oxydants) et un bac traité par addition direct de MELAFIX™ un produit de la société RENA destiné à améliorer les chances de survie lors de l'acclimatation.

Chaque lot est suivi dans le temps, en notant la mortalité et les résultats des autopsies.

#### Expériences portant sur un Dactylogyridae

A partir d'un groupe de 42 piranhas (*Pygocentrus nattereri*.) montrant des anomalies de comportement, on a pu isolé un parasite : *Dactylogyrus sp.*. Afin d'évaluer l'étendue de l'infestation parasitaire, 9 poissons sont prélevés et anesthésiés au phenoxy-2-éthanol. On réalise, sur chaque animal, un frottis du premier arc branchial. Le nombre de parasites présents est décompté. Puis les poissons sont réintroduits dans le pool d'origine.

Le groupe est divisé en sept lots de 6 individus. Ils sont placés en bacs de 100 l, équipés d'une pompe de filtration, et traités de la même manière que dans l'expérience précédente. Seules des concentrations limites n'entraînant pas de mortalité seront utilisées, à savoir : 5 et 10 mg/l d'oxydants en addition direct et 25, 50, 100 et 200 d'oxydants en bain d'une durée respective de 20, 10, 5 et 2.5 minutes. Au bout de 72 heures, chaque lot est anesthésié et la quantité de Dactylogyridae présents sur les branchies est relevée. Après quoi, les poissons sont réintroduits dans leurs bacs d'origine et leur mortalité est surveillée.

#### Expériences portant sur un autre Plathelminthes : *Benedenia sp.*

Cette expérience a été menée au sein du centre national de la mer : NAUSICAA (sous la responsabilité de Mr Hénard), où l'on a relevé la présence de *Benedenia sp.*, sur des *Gnathanodon speciosus*. Les animaux sont séparés en deux lots de 35 individus dans des cuves de réserve, en eau de mer. Le premier servira de témoin et le second sera traité à hauteur de 20mg/l d'oxydants. Après 12 heures de test, le pH et le potentiel redox sont relevés. Au bout de trois jours, les poissons subissent un bain d'eau douce. L'eau de ce bain est passé sur tamis (80 µm) et l'on dénombre la quantité de vers plats recueillis. Trois semaines plus tard, la balnéation est renouvelée, ainsi que le décompte des agents pathogènes.

## Face à des agents non pathogènes

### Le cas des planaires en bacs récifaux

Bien que n'étant pas pathogènes, les planaires représentent un danger pour les coraux. En effet, leur sécrétion de mucus étouffent les invertébrés et finit par les détruire. Nous avons donc cherché à vérifier s'il était possible d'en venir à bout, sans pour autant mettre en péril les organismes coralliens. Ces expériences ont été réalisées au sein d'Océanopolis, à Brest.

La première partie consiste à travailler *in vitro*. Des planaires sont déposés en boîte de Pétri contenant une solution d'Hydrogent® diluée à 5, 10, 50 et 100 mg/l d'oxydants. Le nombre de planaires restant actifs est mesuré régulièrement, au cours du temps. Pour ce faire, le liquide est agité et les animaux remis en suspension. Seront considérés comme actifs, tous les animaux présentant une activité motrice, après l'agitation.

En parallèle, différentes espèces de coraux (*Stylophora pistillata*, *Seriatopora hystrix*, *Montipora foliosa*, *Montipora digitata* et *Zoanthus sociatus*) sont soumises aux mêmes concentrations d'oxydants, pour une durée correspondant à l'inactivation de l'ensemble des planaires.

Enfin, l'expérience est tentée *in vivo*. Dans un bac récifal, contenant les espèces de coraux précédentes plus *Acropora sp.* et des gorgones, on traite à quatre reprises à 5, 10, 15 et 20 mg/l d'oxydants afin d'en éliminer les intrus.

## Traitements statistiques des données

L'ensemble des traitements statistiques réalisés ont pour bases mathématiques le livre de J.A. Fondarai : "voyage en biostatistique", aux éditions Elsevier (2000).

# Résultats

# 1. Choix des techniques de dosage adaptées

L'emploi des bandelettes s'est très vite révélé insuffisamment précis pour les concentrations d'Hydrogent<sup>®</sup> utilisées. Il leur a donc été préféré les deux autres techniques : la spectrophotométrie et la colorimétrie.

La première permet d'obtenir un résultat précis en moins de cinq minutes. Ses principaux défauts viennent de son coût de revient (la nécessité d'acquérir un spectrophotomètre et le prix des tubes) ainsi que des perturbations possibles de la lecture dans les eaux fortement chargées en matière organique.

La seconde est plus économique, mais la durée de manipulation est augmentée (proche d'un quart d'heure par dosage) et la précision est moindre. Il faut considérer que le virage de couleur est appréciable à 0.2 ml près (soit 0.17 mg/l).

Les deux techniques ayant été employées, il nous a fallu standardiser les valeurs acquises. Pour cela, nous avons eu recours à une gamme d'étalonnage.

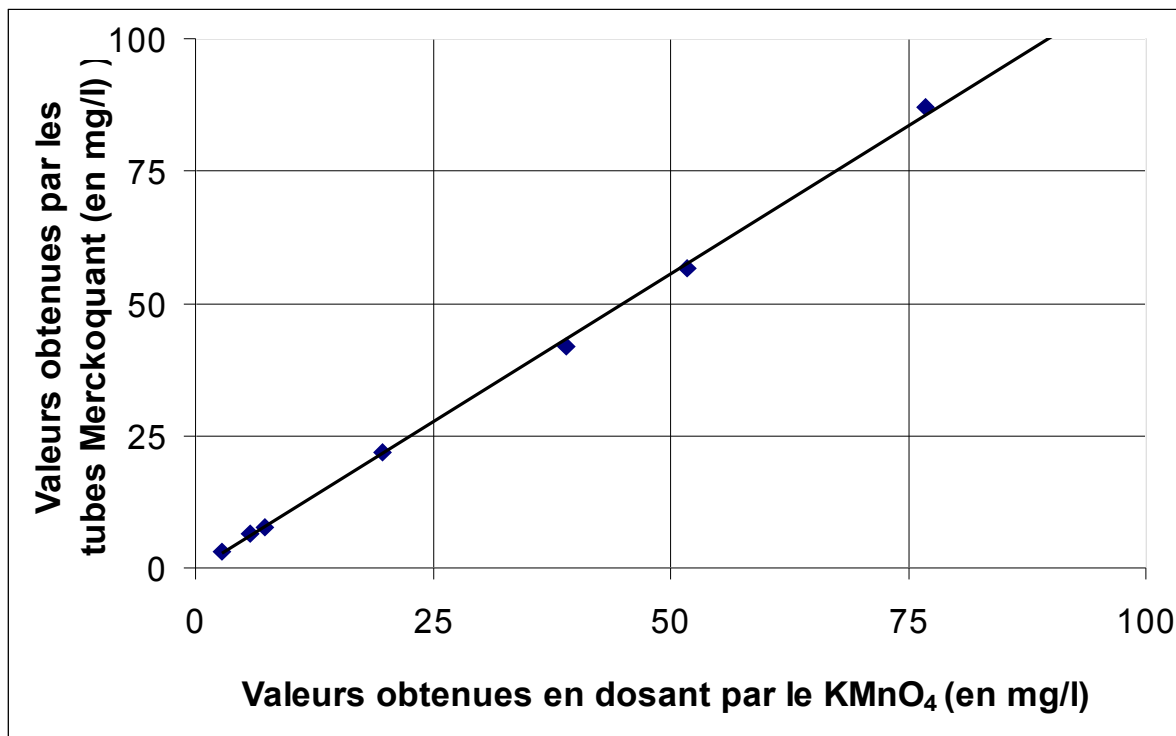


Figure 1 : Valeurs des concentrations en hydrogent<sup>®</sup> mesurées par spectrophotométrie en fonction de celles obtenues par colorimétrie.

Il est possible de convertir les concentrations obtenues par colorimétrie en concentrations que l'on obtiendrait par la spectrophotométrie. Pour cela, il faut appliquer la formule suivante :

$$\text{dosage par les tubes Merck} = 1,12 \text{ dosage par le } KMnO_4 - 0,42.$$

Toutes les concentrations données, ultérieurement, proviendront soit d'un dosage par tube directement, soit du calcul d'une équivalence.

## Représentativité du dosage

Les deux techniques retenues pour suivre la décroissance du produit sont théoriquement commercialisées pour doser l'eau oxygénée. Le calcul théorique permet d'évaluer la concentration en peroxyde d'hydrogène à 170 g/l et celle en acide peracétique à 190 g/l, soit un total de 360 g/l d'oxydants. Or, par rétrocalcul, à partir de différents dosages obtenus, la concentration initiale en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seule, serait de 360 g/l. Il semble que les deux techniques prennent en compte l'ensemble des substances oxydantes. Il sera donc possible d'évaluer globalement la quantité d'Hydrogent® en mg/l d'oxydants ; sachant qu'une concentration de 1 mg/l d'oxydants correspond à 2,8 µl de produit par litre d'eau.

## 2. Cinétique de décomposition de l'Hydrogent®

### Influence des composantes environnementales

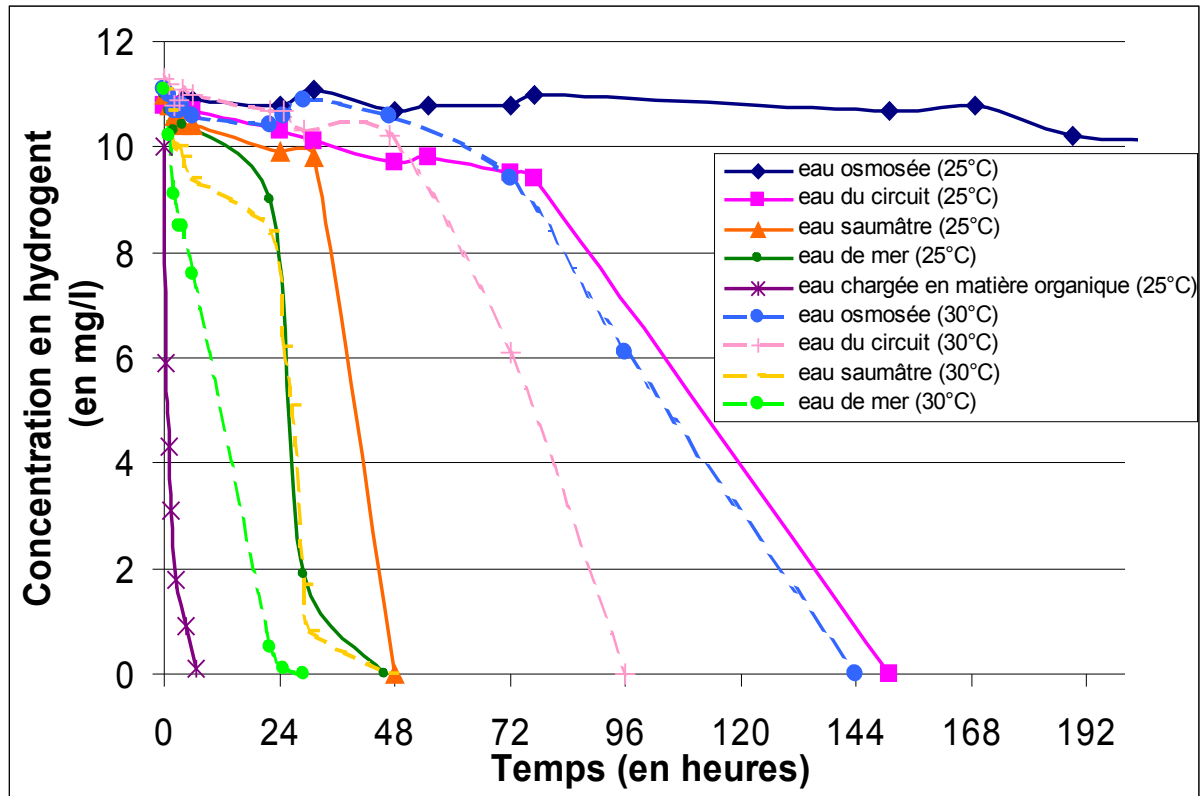


Figure 2 : Comparaison de la vitesse de décomposition de l'Hydrogent®, en fonction des conditions environnementales auxquelles est soumis le produit.

A 25°C, la concentration en composés oxydants est parfaitement stable dans l'eau osmosée, durant au moins 200 heures. Elle le reste relativement dans une eau de circuit durant une centaine d'heures, avant de connaître une décroissance rapide. Le même phénomène s'observe en milieu plus ou moins salé. Le point de départ de la chute rapide du taux d'Hydrogent® est fonction de la salinité. Plus cette dernière est importante et plus la dégradation est précoce. Enfin, en présence de matière organique, avec laquelle réagit le produit, la décomposition de l'acide peracétique et du peroxyde d'hydrogène est extrêmement rapide. En sept heures, à peine, il ne reste plus que quelques traces du produit.

En augmentant la température de 5°C, on remarque que pour des salinités similaires la vitesse de dégradation de l'Hydrogent® est nettement augmentée. La disparition des oxydants dans une eau osmosée à 30°C devient comparable à celle observée dans une eau de circuit à 25°C. De même, la libération d'oxygènes singulets dans une eau saumâtre à 30°C se fait avec la même rapidité que dans une eau à 25°C dont la salinité est 2,3 fois supérieure. D'une manière générale, la durée de vie du produit est quasiment divisée par un facteur 1,5. La chaleur est donc un facteur très influent.

## Influence de la filtration

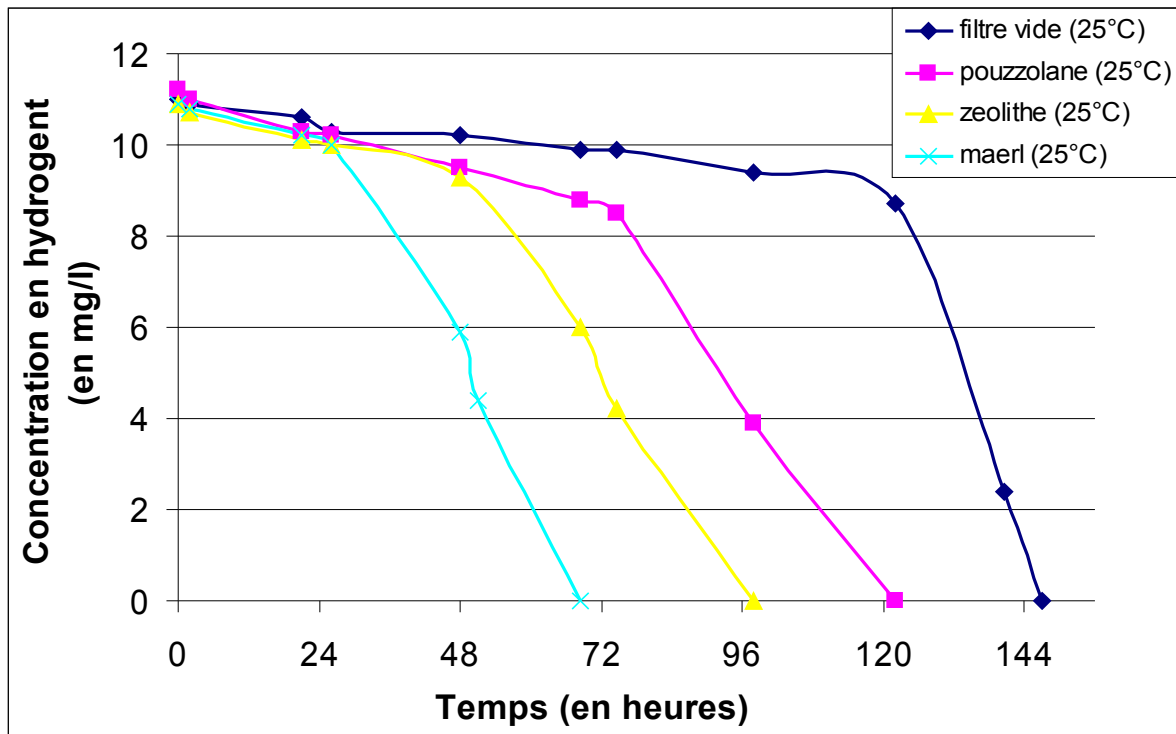


Figure 3 : Comparaison de la vitesse de décomposition de l'Hydrogent<sup>®</sup>, en fonction des matériaux de filtration utilisés.

On notera que le changement de type de brassage (passage du brasseur à la pompe du filtre) n'influe pas sur la vitesse de décroissance, puisque cette dernière est proche de celle observée dans le graphique précédent pour une eau de circuit, à 25°C. Par contre, la présence de matière filtrante n'est pas sans effet, puisque même la pouzzolane considérée généralement comme un corps neutre accentue la décomposition de l'Hydrogent<sup>®</sup>. La zéolithe est également un agent de dégradation du produit. La plus forte des interactions a lieu avec le maërl. Tous ces matériaux de filtration semblent susceptibles de réagir avec les composants du traitement, soit par des phénomènes d'adsorption soit comme catalyseur de la réaction de libération de l'oxygène libre.

## Présentation de deux cas concrets

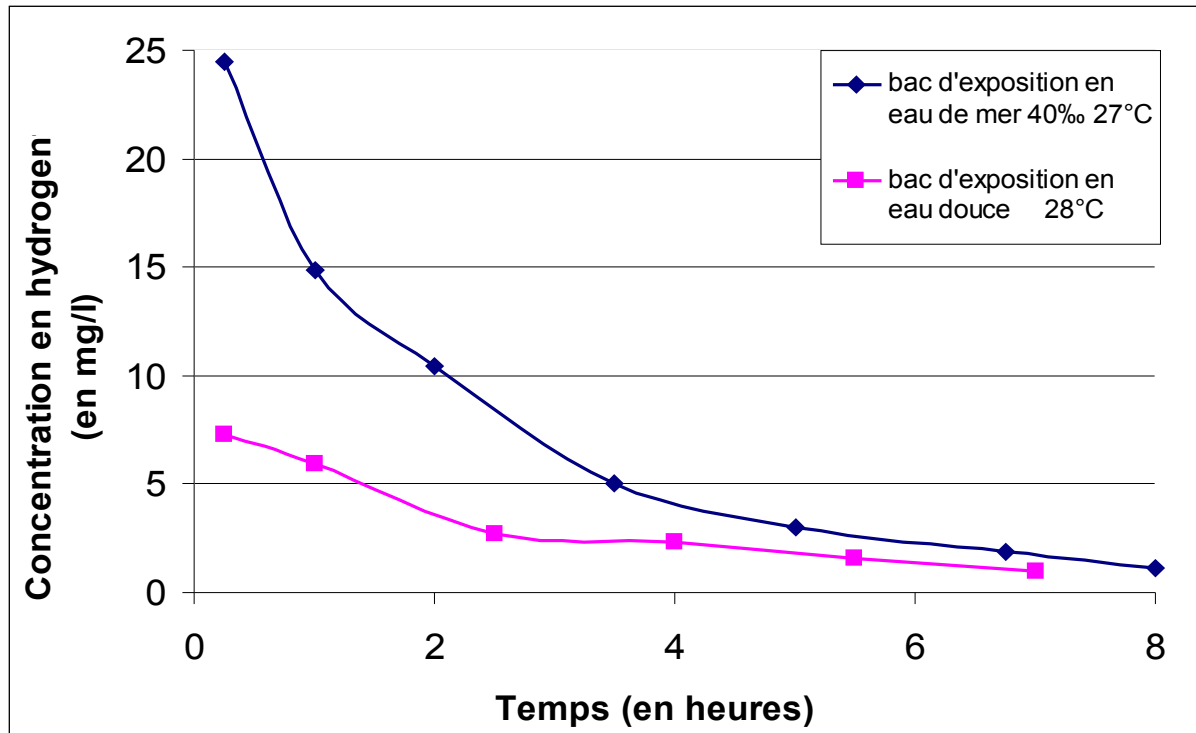


Figure 4 : Etude de la vitesse de décomposition de l'Hydrogent® dans deux bacs d'exposition au public.

Taux d'ATP relevé dans les bacs  $\approx$  500 URL

En conditions réelles, la concentration en Hydrogent® diminue très rapidement, aussi bien en eau de mer qu'en eau douce. Mais, la salinité élevée et la présence de maërl, dans la cuve contenant les carangues, sont des facteurs accentuant la décomposition du produit. On note l'absence de la phase de décroissance lente obtenue dans les bacs expérimentaux. Il est difficile d'extraire un paramètre spécifique responsable de l'aspect de cette cinétique. Mieux vaut attribuer cette évolution à l'ensemble des conditions réunies au sein des bacs d'exposition.

### 3. Etude ATPmétrique

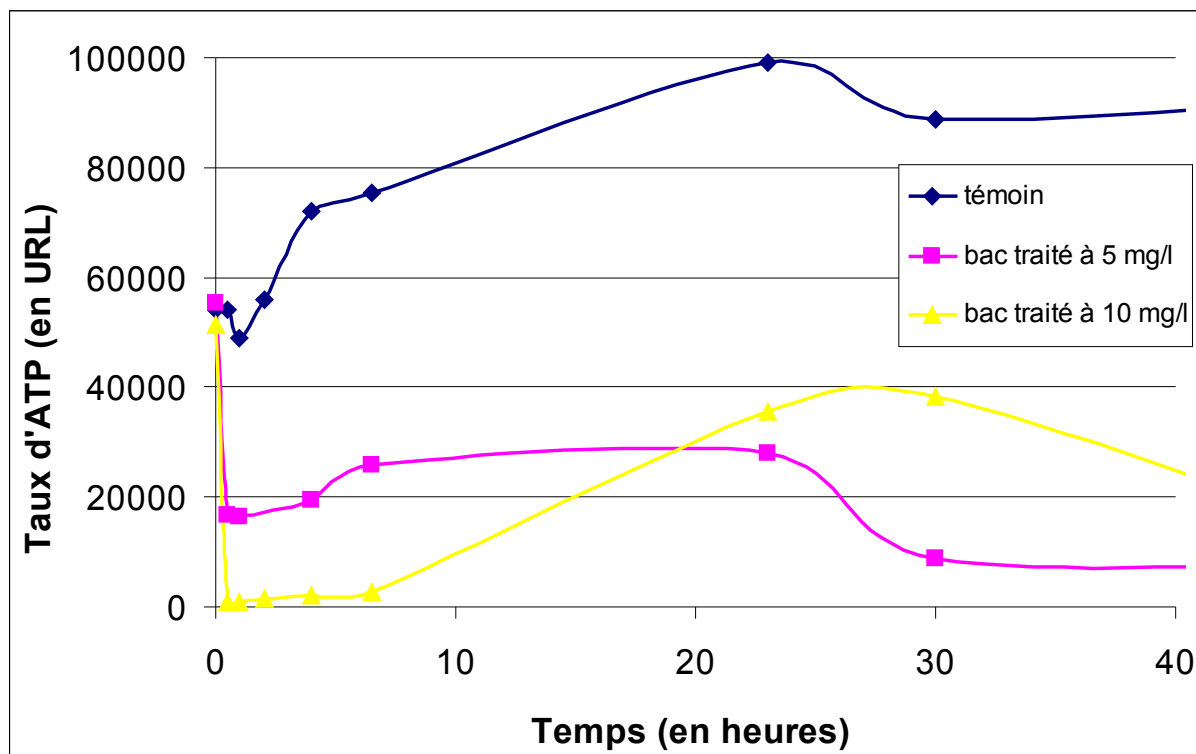


Figure 5 : Evolution de la quantité d'ATP présente dans un bac contaminé, à 25°C, après traitement à différentes doses d'Hydrogent®.

Tableau 1 : Cinétique de l'Hydrogent®, dans les deux bacs traités.

Temps (en heures)	0	1.5	4	6.5	23	30
Concentration en hydrogent (en mg/l d'oxydants)	5	2.8	1.8	1.6	0.7	0.3
Concentration en hydrogent (en mg/l d'oxydants)	10	3.8	2.8	2.3	1.3	0.5

La concentration en ATP va chuter immédiatement après l'ajout d'Hydrogent®. Plus la dose de produit est élevée et plus cette chute est importante. La quantité d'adénosine tri phosphate va se stabiliser, au moins, durant quelques heures : quatre pour le bac traité à 5 mg/l et six et demi pour le bac traité à 10 mg/l. Ceci correspond avec une concentration de produit traitant proche de 2mg/l d'oxydants. Il semble qu'au dessous de ce seuil la prolifération des microorganismes ne soit plus stoppée. Au delà de trente heures, l'ATP va de nouveau commencer à décroître malgré la quasi disparition des oxydants.

Il faut noter que sur la durée de l'expérience, le témoin s'est enrichi en ATP et s'est stabilisé aux alentours du maximum mesurable par l'appareillage.

## 4. Influence du produit sur la décroissance des nitrites

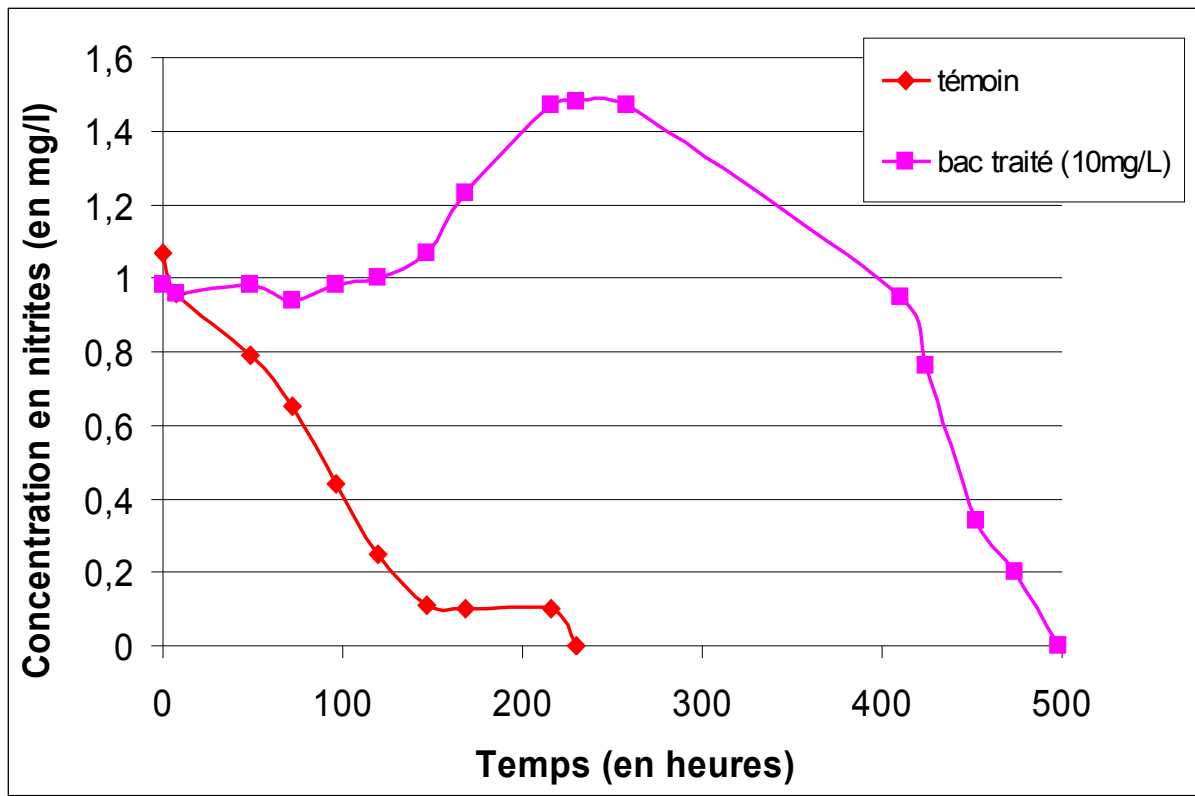


Figure 6 : Comparaison de l'évolution de la concentration en nitrites dans deux bacs d'expérimentation à 25°C, l'un traité à d'hydrogent<sup>®</sup> (10 mg/l d'oxydants), l'autre servant de témoin.

Il faut compter 230 heures environ pour que les bactéries du cycle de l'azote puissent faire chuter la concentration en nitrites de 1 mg/l à 0. L'apport d'Hydrogent<sup>®</sup> multiplie cette durée par deux. De plus, durant ce laps de temps, un accroissement naturel va amener la concentration en  $\text{NO}_2^-$  à 1,5 mg/l. L'activité des microorganismes semble être réduite, voire totalement supprimée durant les 230 premières heures. Il reste un inoculum bactérien durant ce laps de temps, puisque la dégradation des nitrites finit par reprendre, mais il est inactif.

## 5. Evaluation des seuils de toxicité

Tableau 2 : Détermination des maxima de durée et de concentration supportables par les poissons, à 25°C, en fonction du mode de traitement. (\* différence significative avec le témoin)

Concentration (en mg/l d'oxydants)	Durée du traitement (en min)	Mortalité à 96 h	Mortalité à 96 h En pourcentage
témoin		0/30	0%
5	Ajout direct	0/30	0%
10	Ajout direct	0/30	0%
20	Ajout direct	30/30	100%*
25	10	1/30	3%
	20	0/30	0%
	30	10/30	33%*
50	10	3/30	10%
	20	10/30	33%*
100	5	3/30	10%
	10	16/30	53%*
200	2.5	0/30	0%
	5	20/30	66%*

Cette évaluation met en évidence un seuil dans les concentrations et les durées de traitements. Pour les additions du produit directement dans le bac, la dose de 10 mg/l d'oxydants est acceptable sans problème; mais au delà, la survie des animaux est plus hasardeuse. En ce qui concerne les baignations rapides, le rapport "concentration du produit en oxydants X durée de baignation" ne doit pas excéder 500. Passé ce coefficient, la mortalité s'accroît de manière significative.

Les animaux morts et autopsiés présentent tous des lésions branchiales. Ces lésions apparaissent à courte échéance et sont semblables à des nécroses. Les lamelles branchiales sont décolorées, presque blanches. L'examen microscopique révèle que la cohésion tissulaire est rompue.

## 6. Evaluation du potentiel thérapeutique

### Expériences menées sur *Gyrodactylus sp.*

Tableau 3 : Détermination des taux de mortalité dus à *Gyrodactylus sp.*, après traitement des bacs (à 24°C). \*différence significative et \*\* hautement significative avec le témoin.

Produit utilisé	Nombre d'individus	Mortalité après une semaine	Mortalité en pourcentage	Présence du parasite après traitement
Témoin	37	19	51%	oui
Hydrogent <sup>®</sup> à 5 mg/l d'oxydants	37	8	22%**	oui
Hydrogent <sup>®</sup> à 10 mg/l d'oxydants	37	15	41%	oui
Hydrogent <sup>®</sup> à 20 mg/l d'oxydants	18	18	100%	oui
MELAFIX <sup>™</sup>	37	13	35%*	oui

La présence du parasite entraîne une mortalité importante chez les animaux. Et quel que soit le traitement, Hydrogent<sup>®</sup> ou produit d'acclimatation de la société RENA, le pathogène est toujours présent. Mais ces deux solutions permettent d'obtenir une augmentation du taux de survie. Dans le cas présent, on peut de nouveau observer les effets néfastes d'une trop forte concentration en oxydants (20 mg/l d'oxydants). Il faut noter que pour les guppies, une dose de 10 mg/l d'oxydants semble avoir des effets thérapeutiques très limités.

### Expériences menées sur *Dactylogyrus sp.*

Le nombre de parasites prélevés est réduit dans tous les cas de figure (Tableau 4). Le seul fait d'isoler les animaux à une faible densité dans les bacs limite l'infestation du parasite. Cependant la quantité de *Dactylogyrus* reste importante sur le témoin, alors que les parasites sont bien moins nombreux chez les poissons traités. Le meilleur résultat correspond à une baignade de cinq minutes dans une solution d'Hydrogent<sup>®</sup> à 100 mg/l d'oxydants. Grâce à cette combinaison, l'ensemble des éléments pathogènes ont été supprimés. D'autres combinaisons, telles que : un ajout direct à hauteur de 10 mg/l d'oxydants ou une baignade à 200 mg/l d'oxydants durant 2.5 minutes, offrent de bons résultats sans toutefois éradiquer les *Dactylogyrus sp.*. Le traitement à 20 mg/l sur une durée de 20 minutes semble être une thérapie insuffisante.

Tableau 4 : Quantité moyenne de parasites par lamelle branchiale, avant et après divers traitements à l'Hydrogent®.

Nombre moyen de parasites par poisson avant traitement	Concentration en oxydants (apportés par l'Hydrogent®) et durée du traitement, à 25°C	Nombre moyen de parasites par poisson 72h00 après traitement	Taux de survie à 96h00
35	témoin	26	100%
	5 mg/l	9	
	10 mg/l	4	
	25 mg/l durant 20 minutes	15	
	50 mg/l durant 10 minutes	8	
	100 mg/l durant 5 minutes	0	
	200 mg/l durant 2.5 minutes	5	

### Expériences menées sur *Benedenia sp.*

Tableau 5 : Quantité de parasites récupérée, après balnéation à l'eau douce de deux lots d'animaux, l'un ayant été traité et l'autre non.

Concentration en oxydants	pH	Potentiel redox (en mV)	Nombre de parasites récupérés après 72 h	Nombre de parasites récupérés après 3 semaines
Témoin	8.03	200	235	252
≈ 20 mg/l	7.90	240	aucun	364

Le traitement entraîne une légère baisse du pH, tandis que le potentiel redox est augmenté. La balnéation permet d'observer l'absence de parasites sur les individus traités à l'Hydrogent®. Cependant, ces vers plats refont leur apparition dans les semaines qui suivent. Il existe donc une ou plusieurs formes du cycle de *Benedenia sp.* capable de résister aux oxydants.

## Expériences menées sur des planaires en bacs récifaux

Tableau 6 : Détermination de la sensibilité des planaires et des coraux aux oxydants

Concentration en Hydrogent®	Durée	Individus actifs / total	Survie des coraux
témoin	1 h	57 / 59	oui
	2 h	56 / 59	
	3 h	56 / 59	
5 mg/l d'oxydants	1 h	43 / 49	oui
	2 h	27 / 49	
	3 h	0 / 49	
10 mg/l d'oxydants	1 h	24 / 54	oui
	1 h 30	16 / 54	
	2 h	0 / 54	
50 mg/l d'oxydants	5 min	16 / 62	oui
	10 min	0 / 62	
100 mg/l d'oxydants	2 min 30 s	0 / 51	oui

A fortes concentrations en Hydrogent® (50 et 100 mg/l d'oxydants), les planaires seront inactivés en très peu de temps. Une rapide balnéation permet de s'en débarrasser. Par contre, pour des taux d'oxydants plus faibles, il faut compter quelques heures.

Dans les deux cas, les coraux supportent très bien le traitement. On notera même que les polypes restent déployés dans la solution à 5 mg/l. Deux semaines après les expériences, ils sont toujours vivants et marquent des signes de croissance.

Les manipulations *in vivo* ont montré que les doses de 5 et 10 mg/l étaient sans effet, tandis que pour 15 et 20 mg/l, on remarque une réduction du nombre de vers plats. Dans tous les cas, la rapide dégradation du produit ne semble pas avoir maintenu suffisamment de substance active pour éliminer les planaires.

# discussion

## 1. résolution du problème de dosage

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de technologies faciles d'utilisation permettant de doser, séparément et précisément, les quantités relatives de peroxyde d'hydrogène et d'acide peracétique dans l'Hydrogent<sup>®</sup>. Cette contrainte s'applique particulièrement pour suivre la cinétique du produit. Il est possible de déduire la proportion de chaque composant présent à l'origine (190 g/l d'acide acétique et 170 g/l d'eau oxygénée) par le calcul. Mais cela ne l'est plus à partir du moment où les deux éléments peuvent réagir différemment en fonction des conditions auxquelles ils sont soumis. Seul un suivi de la quantité globale d'oxydants peut être mis en place.

## 2. Comportement et influence du produit en milieu aqueux

L'Hydrogent<sup>®</sup> est un produit stable, le taux d'oxydants dans un bidon entamé depuis plusieurs mois est le même que dans un récipient neuf. Cette stabilité est de nouveau mise en évidence dans l'eau osmosée. Les techniques de brassage employées, que ce soit l'agitation de la masse d'eau par le brasseur ou le jet d'eau produit par la pompe de filtration, sont proches des agitations rencontrées dans un aquarium d'exposition. Elle ne semble pas être un facteur influant sur la décroissance du produit.

Par contre, la minéralisation, la salinité et la température de l'eau ont une nette influence. Chacun de ces facteurs accélère la dégradation. Les matériaux de filtration représentent également des éléments susceptibles d'influer sur la décroissance du taux d'oxydants. Dans le cas du maërl, cela peut s'expliquer par la présence de carbonate de calcium. Le calcaire présent dans ces roches et dans l'eau du circuit peut donc être mis en avant en temps qu'élément réagissant avec l'Hydrogent<sup>®</sup>. Cependant, la pouzzolane et la zéolithe, réputées pour être chimiquement neutre, ne sont pas sans effet. Ceci montre que notre produit est capable de réagir chimiquement ou physiquement avec de multiples substrats.

Il faut noter que cette dégradation a lieu en deux temps : une phase de décroissance lente puis une chute rapide. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une réactivité propre de chacun des composants. L'acide peracétique étant plus prompt que le peroxyde d'hydrogène à libérer de l'oxygène libre, ou inversement. Cependant ceci reste une hypothèse, puisque ce changement de vitesse a lieu à des concentrations où les deux éléments sont encore nettement représentés dans le milieu.

Cette succession de deux phases n'apparaît plus lorsque le produit est en présence de matière organique. La dégradation des deux oxydants est extrêmement rapide dans ce cas, puisqu'elle a lieu en quelques heures. Cela met en évidence la capacité du produit à réagir rapidement avec les corps vivants (Petasne et Zika 1997), ce qui est le but recherché. Mais il conviendra de prendre en compte le fait

que la durée d'action du produit sera limitée dans le temps lorsque l'on travaillera sur des cuves fortement chargées en matière organique.

Les conditions réunies dans un bac d'exposition sont une synthèse des différents facteurs que nous avons testés. L'Hydrogent<sup>®</sup> y réagit avec les éléments dissous, les décors, le substrat, les plantes et les animaux présents ; sans oublier la température et la salinité. L'ensemble donne lieu à une dégradation rapide des deux oxydants.

Il conviendra donc d'être prudent quand à l'interprétation des résultats obtenus lors des diverses manipulations. En effet, la plupart d'entre elles ont été réalisées en eau douce, dans des bacs de réserve exempts de sources réactives. Il conviendra donc d'ajuster les traitements, lorsque ceux-ci seront réalisés sur des aquariums de présentation au public. Ajustement qui peut être réalisé grâce à un suivi précis de la cinétique de décroissance des oxydants.

Un phénomène particulier observable lors du traitement des eaux par l'Hydrogent<sup>®</sup>, est l'augmentation du potentiel d'oxydo-réduction. Cette augmentation est considérée comme une bonne chose en aquariologie, puisqu'elle correspond à un gain dans l'élimination des substances néfastes telles que les résidus de pesticides (Hwang *et al.* 2001). Elle a été observée à Nausicaa sur une courte période et au M.A.A.O. (Hignette 1993), où a été mise en évidence une progression de 100 mV du potentiel redox, sur une longue période, en utilisant des oxydants W. Il ne s'agit là que d'eau oxygénée, sans acide peracétique, mais il est peu probable qu'il n'en soit pas de même avec la combinaison des deux oxydants.

### **3. L'hydrogent<sup>®</sup> comme outil de désinfection**

L'Hydrogent<sup>®</sup> réagit avec la matière organique vivante. C'est ce que montrent les expériences réalisées sur l'ATP. Dès l'ajout du produit, bon nombre de microorganismes sont détruits. Le retour à la transparence de l'eau des bacs traités est un bon signe de l'amélioration des conditions sanitaires.

S'il n'est pas possible de définir de manière ciblée l'action du produit, ni de pouvoir certifier que telles ou telles espèces y sont sensibles, nous pouvons affirmer que l'ensemble de la faune, de la flore et des champignons microscopiques, se développant dans un milieu contaminé, subit l'effet désinfectant des deux oxydants. Cette capacité avait déjà été mise en évidence par plusieurs auteurs (Stampi *et al.* 2001, Lambert *et al.* 1999, Bonadonna *et al.* 1999), sur leur aspect bactéricide, virucide et fongicide. C'est à ce titre que le produit est utilisé actuellement en milieu hospitalier pour la désinfection des sondes d'endoscopie (information du fournisseur).

Une fois l'acide peracétique et de le peroxyde d'hydrogène dégradés, la présence résiduelle de matière organique vivante va permettre une ré-augmentation du taux d'ATP. En effet, l'usage du produit ne dispense pas d'un nettoyage visant à éliminer définitivement les contaminants ayant survécu au traitement. Ceci, afin d'éviter qu'une recontamination ne se mette en place à partir de l'inoculum restant.

## Effet du produit sur les filtres biologique

Nous avons vu que l'Hydrogent® réagit avec les masses filtrantes, mais il supprime également les bactéries présentes dans les filtres biologiques. Il y a alors un risque de voir les taux d'ammoniaque et de nitrites croître sensiblement dans la période qui suit le traitement (Delaporte 1998). Pour éviter ce type de problème, il conviendra d'isoler le bac de son système de filtration. Du moins, pendant les premières heures, le temps que la majeure partie des oxydants soit décomposée.

## 4. Toxicité

Les références publiées portant sur la toxicité du peroxyde d'hydrogène sont centrées sur la salmoniculture (donc en eau froide). Elles portent sur le traitement des différents stades de développement : sur les œufs (Gaikowski *et al.* 1998, Rach *et al.* 1998) ou sur les stades larvaires (Gaikowski *et al.* 1999) et sur les pathologies branchiales dues au traitement (Kierner et Black 1997, Powell et Perry 1997, Tort *et al.* 1998). Ces articles mettent en évidence l'importance de la température sur la mortalité, quelques degrés de différence peuvent induire un accroissement très significatif de la gravité des lésions observées sur les arcs branchiaux. Les observations que nous avons pu effectuer, sur des animaux traités, mettent en évidence des dommages similaires. Il apparaît également que les concentrations testées sont bien supérieures à celles utilisables avec de l'Hydrogent®, puisqu'elles peuvent atteindre 1.4 g/l d'eau oxygénée sans causer de mortalité.

Ces travaux présentent un intérêt limité dans le cadre de l'aquariologie. En effet, les températures élevées et la faible résistance de certains animaux ne permettent pas de mettre en œuvre les protocoles décrits. Nous avons donc eu recours principalement aux approches effectuées par deux précédents stagiaires ayant déjà travaillé sur le mélange peroxyde d'hydrogène - acide peracétique (Chentrier 1999, Bordat 2000).

## Modes de traitement et risques associés

### Traitement par addition directe du produit dans les bacs

En eau douce, il semble que jusqu'à 10 mg/l d'oxydants, le produit soit toléré par la plupart des espèces. Des essais supplémentaires effectués au sein de la société "serres aquatiques", localisée à Betheny, n'ont montré aucune mortalité pour les espèces les plus couramment commercialisées.

En eau de mer, la stabilité de l'Hydrogent® diminue avec la salinité : la durée effective du traitement sera donc moindre. De même, si le traitement est effectué

dans un bac de présentation, le temps de contact sera plus restreint que dans un bac expérimental, en raison de la rapide dégradation de l'acide peracétique et du peroxyde d'hydrogène. Il conviendra donc d'adapter la stratégie de traitement. La première solution consiste à augmenter les quantités d'oxydants apportées initialement. La seconde consiste à suivre l'évolution de la concentration en oxydants au cours du temps. Dès que cette dernière descend au dessous de 5 mg/l d'oxydants, on réintroduit une nouvelle dose de produit. Ainsi la concentration en hydrogent<sup>®</sup> est maintenue dans une plage de traitement efficace, sur une durée suffisante.

### Traitement par balnéation

Malgré le stress induit par ce type de manipulation, la plupart des animaux testés y résistent bien. Le produit "concentration en oxydants (en mg/l) par temps de contact (en minutes)" ne devra pas être supérieur à 500. Au delà de ce seuil, les poissons montrent des signes de détresse respiratoire. Signes qui aboutissent généralement à la mort d'une grande partie des individus. Le problème de la salinité ne se pose pas dans ce type de procédure, puisque la concentration du produit n'aura pas le temps de décroître significativement.

## 5. L'hydrogent® comme outil thérapeutique

Le problème rencontré en abordant l'aspect toxicologique se répète. En effet, la bibliographie concerne l'eau oxygénée seule. Elle permet, à forte dose de traiter efficacement contre les ectoparasites (Treasurer et Grant 1997, Mischke *et al.* 2001, Montgomery-Brock *et al.* 2001) les bactéries (Speare et Arsenault 1997, Lumdsen *et al.* 1998) et les champignons (Fitzpatrick *et al.* 1995). Mais, les concentrations et les températures ne sont pas applicables à l'aquariologie.

Cependant, il existe trois articles traitant spécifiquement du Détarox®, un mélange de peroxyde d'hydrogène et d'acide peracétique proche de l'Hydrogent®. Ce produit est évoqué en temps que fongicide et bactéricide (Rahkonen et Koski 2002). Il est présenté comme antiparasitaire efficace contre *Trichodina sp.* (Madsen *et al.* 2000) et comme virucide par une note technique du groupe des laboratoires de référence pour les maladies des poissons (1999).

Nos propres expériences tendent à confirmer l'action du produit sur les parasites externes de type Plathelminthes.

### Efficacité du produit sur les Plathelminthes pathogènes

#### *Gyrodactylus sp.*

Même si les parasites n'ont pas pu être totalement éliminés, le traitement a permis de limiter la mortalité de manière significative. Lors des traitements réalisés, le guppy s'est révélé particulièrement sensible au produit. Des essais ultérieurs nous ont permis de remarquer qu'une dose de 10 mg/l d'oxydants n'entraînait pas de mortalité, mais induisait des signaux de détresse dans le comportement de l'animal.

#### *Dactylogyrus sp.*

Les piranhas sont réputés pour être des poissons sensibles aux traitements et tout particulièrement au Néguvon. Ils représentent donc de très bon candidats pour tester le produit. Test qui s'est avéré fructueux puisque dans toutes les combinaisons thérapeutiques, la mortalité est restée nulle et que nous sommes parvenu à éliminer les parasites par un traitement à 100 mg/l d'oxydants durant 5 minutes. L'Hydrogent® représente donc une excellente alternative pour ce genre de pathologie.

Les essais réalisés ultérieurement par Patrick Couchou-Meillot (pathologiste de la société "serres aquatiques" à Betheny) sur les Dactylogyridae montrent que l'efficacité du produit est équivalente à celle du formol.

### Benedenia sp.

Le cas de *Benedenia sp.* est un problème important en aquariologie. Il touche la plupart des grands aquariums publics, entraînant une dégradation de l'aspect général des poissons atteints (principalement les carangues) ; puis la mort, en l'absence d'un traitement efficace. Il représente également un fléau pour l'aquaculture : sur des élevages de *Seriola dumerili*, au Japon, la prévalence de l'infection peut atteindre 70% (Wakabayashi 1996). Le traitement des animaux directement dans leur bac permet d'éviter la manipulation et donne de bons résultats, puisque toutes les formes adultes sont décrochées. Mais le problème persiste puisque les poissons sont de nouveau parasités au bout de quelques semaines. Il existe, au moins, une forme résistante du parasite. La solution à ce problème réside dans le renouvellement des traitements. Le cycle de développement du pathogène étant de trois semaines environ (Woo 1995), il faut renouveler l'apport d'Hydrogent® toutes les deux semaines. On parvient alors à éradiquer le parasite, comme ce fut le cas au M.A.A.O.

## Efficacité du produit sur des animaux non pathogènes

### Élimination des planaires dans les bacs récifaux

Les traitements thérapeutiques appliqués à un bac récifal sont toujours délicats, en raison de la fragilité des invertébrés marins. Le problème consistait à venir à bout des planaires sans pour autant détruire les coraux. Nous avons pu montrer que si les vers plats sont très sensibles aux oxydants, il n'en est pas de même pour les organismes coralliens : ni leur survie, ni leur croissance n'a été mise en danger. Le problème réside encore dans l'application des résultats obtenus *in vitro*. La décroissance rapide du produit dans les bacs contenant des organismes vivants limite son efficacité. Le maintien de la concentration en Hydrogent® entre 5 et 10mg/l d'oxydants, grâce à la réintroduction régulière d'une dose de produit, pourrait être une thérapie efficace et sans danger pour les organismes coralliens.

### Élimination des *Aiptasia sp.*

Bien qu'elles résistent au traitement par addition directe dans les bacs, il est possible de se débarrasser de ces anémones de mer encombrantes. Le système consiste à réaliser une injection directe de produit pur dans le pied de l'animal. L'invertébré meurt en quelques minutes.

# Conclusion

L'Hydrogent<sup>®</sup> apparaît comme une solution alternative efficace face à la disparition de certaines thérapies actuelles. Son effet est équivalent à celui des produits utilisés aujourd'hui et offre la possibilité de venir à bout de nombreux pathogènes.

Son effet biocide permet d'envisager son utilisation pour purifier l'eau des aquariums. Ses propriétés forment un large spectre de destruction des microorganismes nocifs. Bactéricide, il évite les agressions dues aux bacilles. Algicide, il freine le verdissement et le développement des algues. Fongicide, il limite l'apparition des mycoses. Virucide, il s'attaque à des agents responsables de fortes mortalités. Antiparasitaire, il élimine les Plathelminthes présents sur la peau et les branchies. Ces caractéristiques lui permettent d'augmenter les chances de survie des poissons face à la plupart des agressions biologiques rencontrées dans une structure d'élevage.

Son utilisation peut être envisagée de manière préventive. L'addition du produit dans l'eau des bacs de quarantaine permet de stopper le développement des hôtes indésirables. Même s'il ne parvient pas à les détruire dans leur intégralité, il permet d'échapper à la surinfection.

Il peut être ajouté directement au sein d'une cuve d'exposition. Il conviendra, dans ce cas, de répéter le traitement, afin de venir à bout des formes de résistance possibles. Pour préserver les filtres biologiques, il suffit d'isoler le bac de son système de filtration durant quelques heures. De plus, il ne pose aucun désagrément visuel pour les visiteurs, puisque son absence de coloration ne le rend pas détectable.

Enfin, la balnéation rapide à forte concentration (recommandée à 100 mg/l d'oxydants durant 5 minutes) est un outil de destruction des parasites et de désinfection des lésions externes.

Dans tous les cas, son action ne met pas en cause la survie des animaux présentés. Une utilisation contrôlée du produit permet de sauvegarder les poissons et les espèces sensibles, telles que les coraux.

Enfin, sa dégradation rapide laisse un milieu sain, limitant au maximum les effets secondaires, à long terme. Le seul changement notable pouvant être observé est l'augmentation du potentiel d'oxydoréduction. Or cette modification de la qualité d'eau est considérée comme positive par les aquariologistes. Il peut donc être employé sans prendre le risque de léser l'environnement par la présence de résidus néfastes.

L'Hydrogent<sup>®</sup> est un produit d'avenir, au moins pour l'aquariologie et certainement pour l'aquaculture. Preuve en est que le mélange acide peracétique et peroxyde d'hydrogène est de plus en plus utilisé, aussi bien en France que dans d'autres pays d'Europe.

## **bibliographie**

BONNADONA L., DELLA LIBERA S., VESCHETTI E., CUTILLI D., OTTAVIANI M., DIVIZIA M., DONIA D., GABRIELI R., PANA A., MARTINI C., et ANASTASI P. (1999). – Reduction of microorganisms in sewage effluent using hypochlorite and peracetic acid as disinfectants. *Centr Eur J Health*, 7 (3) : 130-132.

BORDAT T. (2000). – L'aquarium du musée nationale des arts d'Afrique et d'Océanie : expérimentations sur différents produits à base d'eau oxygénée. Rapport de stage, D.I.T. Aquaculture continentale et aquariologie : 40 p.

CHAMPIAT D. et LARPENT J.P. (1993). – Bio-chimi-luminescence. Masson. 211-229.

CHENTRIER C. (1999). – L'eau oxygénée : des utilisations aquacoles ?. Rapport de stage, D.I.T. Aquaculture continentale et aquariologie : 25-34.

CUER P. (1986). – Le peroxyde d'hydrogène : l'eau oxygénée à travers la pharmacopée officielle. Thèse de docteur en pharmacie, université paris V des sciences pharmaceutiques et biologiques : 116 p.

DELAPORTE S. (1998). – L'élimination des déchets azotés. Rapport de stage, D.I.T. Aquaculture continentale et aquariologie : 54 p.

FITZPATRICK M.S. SCHRECK C.B. ET CHITWOOD R.L. (1995). – Evaluation of three candidate fungicides for treatment of adult spring chinook salmon. *The progressive fish culturist*, 57 : 153-155.

FONDARAI J.A. (2000). – Voyage en biostatistique. éditions scientifiques et médicales Elsevier : 150 p.

GAIKOWSKI M.P., RACH J.J., OLSON J.J., RAMSAY R.T. ET WOLGAMOOD M. (1998). – Toxicity of hydrogen peroxide treatments to rainbow trout eggs. *Journal of aquatic animal health*, 10 : 241-251.

GAIKOWSKI M.P., RACH J.J. et RAMSAY R.T. (1999). – Acute toxicity of hydrogen peroxide treatments to selected lifestages of cold-, cool-, and warmwater fish. *Aquaculture*, 178 : 191-207.

HIGNETTE M. (1993). – influence de l'ajout d'oxygène (O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sur le potentiel redox dans deux bacs d'invertébrés marins. European union of aquariums curators, meeting in Naples 10-16 october 1992. Mémoires de l'institut océanographique Paul Ricard : 43.

HWANG E.S., CASH J.N. et ZABIK M.J. (2001). – ozone and hydrogen peroxyacetic acid treatment to reduce or remove EBDCs and ETU residues in a solution. J Agric Food Chem, 49 (11) : 5689-5694.

KIEMER M.C.B. ET BLACK K.D. (1997). – The effects of hydrogen peroxide on the gills tissues of atlantic salmon, *Salmo salar* L.. Aquaculture, 153 : 181-189.

LAMBERT R.J., JHONSTON M.D. et SIMONS E.A. (1999). – A kinetic study of the effect of hydrogen peroxyde and peracetic acid against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* using the bioscreen disinfection method. J Appl Microbiol, 87 (5) : 782-786.

LUMSDEN J.S., OSTLAND V.E. ET FERGUSON H.W. (1998). – Use of hydrogen peroxide to treat experimentaly induced bacterial gill disease in rainbow trout. Journal of aquatic animal health, 10 : 230-240.

MADSEN H.C.K., BUCHMANN K. ET MELLEGAARD S. (2000). – Treatment of trichodiniasis in eel (*Anguilla anguilla*) reared in recirculation sytems in Denmark : alternatives to formaldehyde. Aquaculture, 186 : 221-231.

MARKING L.L., RACH J.J. et SCHREIER T.M. (1994). – Evaluation of antifungal agents for fish culture. The progressive fish culturist, 56(4) : 225-231.

MISCHKE C.C., TERHUNE J.S. et WISE D.J. (2001). – Acute toxicity of several chemicals to the oligochaete *Dero digitata*. Journal of the world aquaculture society, 32(2) : 184-188.

MONTGOMMERY-BROCK D., SATO V.T., BROCK J.A. et TAMARU C. S. (2001). – The application of hydrogen peroxide as a treatment for the ectoparasite *Amyloodinium ocellatum* (Brown 1931) on the pacific Threadfin *Polydactylus sexfilis*. Journal of the world aquaculture society, 32(2) : 250-254.

PETASNE R.G. et ZIKA R.G. (1997). – Hydrogen peroxide lifetime in south florida coastal and offshore waters. Marine chemistry, 56 : 215-225.

POWELL M.D. ET PERRY S.F. (1997). – Respiratory and acid-base pathophysiology of hydrogen peroxide in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss* Walbaum). Aquatic toxicology, 37 : 99-112.

RACH J.J., GAIKOWSKI M.P., HOWE G.E. et SCHREIER T.M. (1998). – evaluation of the toxicity and efficacy of hydrogen peroxyde treatments on eggs of warm- and coolwater fishes. *Aquaculture*, 165 : 11-25.

RAHKONEN R. et KOSKI P. (2002). – Post malachite green : alternative strategies for fungal infections and white spot disease. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*, 22(2) : 152-157.

SPEARE D.J. ET ARSENAULT G.J. (1997). – Effects of intermittent hydrogen peroxide exposure on growth and columnaris disease prevention of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can J Fish Aquat Sci*, 54 : 2653-2658.

STAMPI S., DE LUCA G. et ZANETTI F. (2001). – evaluation of the efficiency of peracetic acid in the disinfection of sewage effluents. *J Appl Microbiol*, 91(5) : 833-838.

TECHNICAL REPORT FROM THE COMMUNITY REFERENCE LABORATORY FOR FISH DISEASES (1999). Danish veterinary laboratory, departement of fish diseases, Arhus, Denmark : 19 p.

TORT M.J., KUHL A.J., WOOSTER G.A. et BOWSER P.R. (1998). – modifications of walleyes *Stizostedion vitreum* tolerance to hydrogen peroxide bath treatment. *Journal of the world aquaculture society*, 29(4) : 499-504.

TREASURER J.W. ET GRANT A. (1997). – The efficacy of hydrogen peroxide for the treatment of farmed atlantic salmon, *Salmo salar* L. infested with sea lice (Copepoda : Caligidae). *Aquaculture*, 148 : 265-275.

WAKABAYASHI H. (1996). – Importation of aquaculture seedlings to japan. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 15 (2) : 409-422.

WOO P.T.K. (1995). - Fish diseases and disorders. CAB international , vol. 1 : 294-317.