

Direction des Ressources Vivantes
Département Valorisation des Produits
Laboratoire de Production et de Biotechnologie des Algues
Rue de l'Île d'Yeu – BP 21105
44311 NANTES cedex 3

Gaël Bougaran
Loïc Le Déan
Céline Loizel*
Ewa Lukomska
Marie-Lise Picquet
Raymond Kaas
Arnaud Muller-Feuga

(*) Ecole Supérieure d'Agriculture d'Angers
05 2001 - R.INT.DRV/VP/PBA 2001/002

Optimisation de l'enrichissement nutritif pour la culture d' *Isochrysis galbana* *affinis Tahiti*

Mai 2001

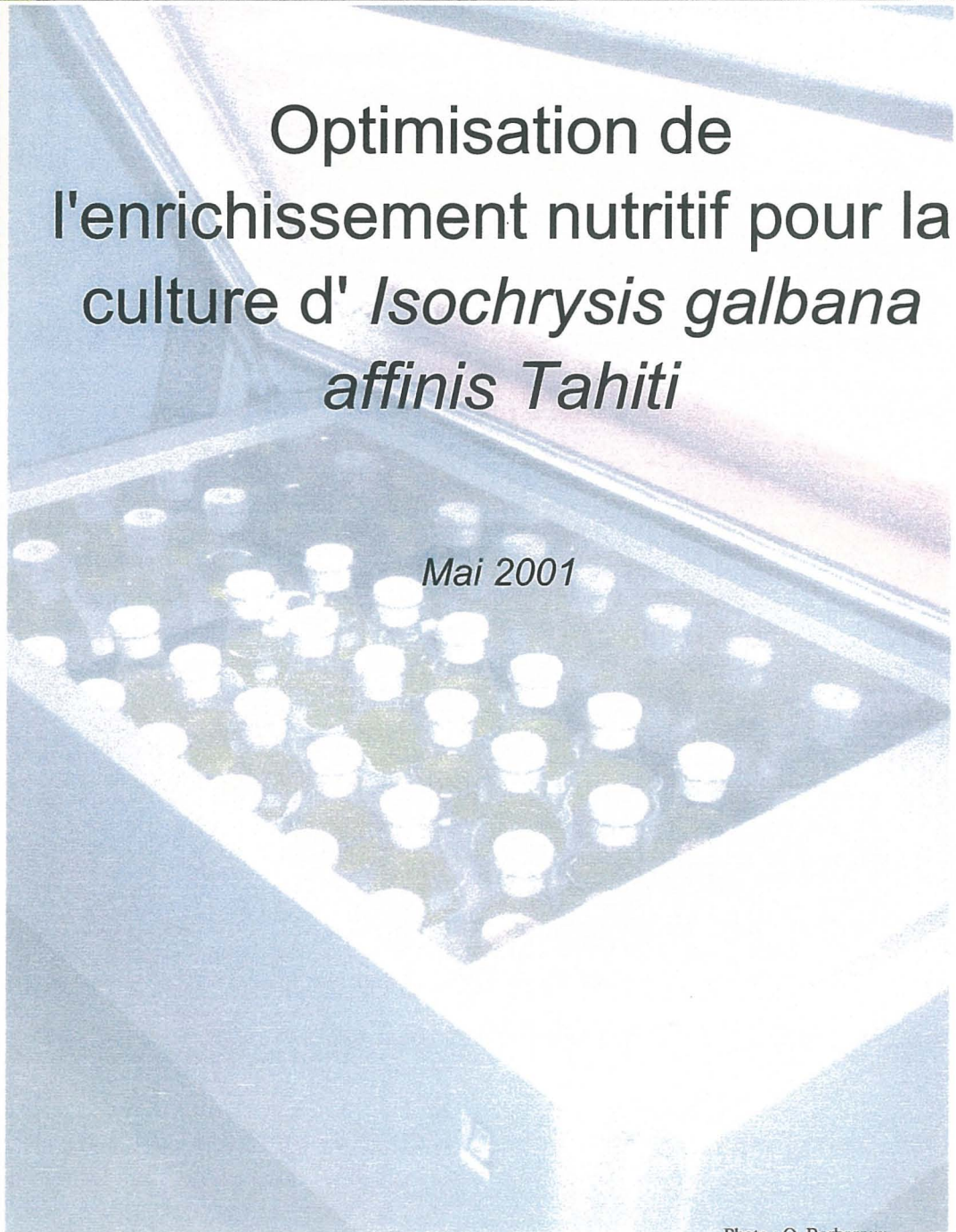


Photo : O. Barbaroux

S O M M A I R E

1	INTRODUCTION	2
2	MATÉRIELS ET MÉTHODES	3
3	RÉSULTATS ET DISCUSSION	5
3.1	RECHERCHE DU SEUIL DE TOXICITÉ DE LA SEC.....	5
3.1.1	<i>Protocole expérimental</i> :.....	5
3.1.2	<i>Résultats et discussion</i> :.....	5
3.2	DÉTERMINATION DU MODE D'EXPRESSION DE LA TOXICITÉ	7
3.2.1	<i>Protocole expérimental</i> :.....	7
3.2.2	<i>Résultats et discussion</i> :.....	8
3.3	DÉTERMINATION DE LA LOGIQUE D'ENRICHISSEMENT EN NUTRIMENTS	10
3.3.1	<i>Protocole expérimental</i> :.....	10
3.3.2	<i>Résultats et discussion</i> :.....	10
3.4	INFLUENCE DE CONCENTRATIONS VARIABLES DE LA SOLUTION PRINCIPALE DE L'ENRICHISSEMENT DE CONWAY.....	13
3.4.1	<i>Protocole expérimental</i> :.....	13
3.4.2	<i>Résultats et discussion</i> :.....	13
3.5	INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE NaNO_3 DE LA SOLUTION PRINCIPALE	15
3.5.1	<i>Protocole expérimental</i> :.....	15
3.5.2	<i>Résultats et discussion</i> :.....	16
3.6	INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE NaH_2PO_4 DE LA SOLUTION PRINCIPALE.....	17
3.6.1	<i>Protocole expérimental</i> :.....	18
3.6.2	<i>Résultats et discussion</i> :.....	19
3.7	PROPOSITION D'UNE FORMULATION D'ENRICHISSEMENT OPTIMISÉE POUR LA CULTURE EN BATCH DE T.ISO.....	20
4	CONCLUSION	22

1 Introduction

La prymnésiophycée *Isochrysis galbana* affinis *Tahiti* (T-iso) est classiquement utilisée comme nourriture de larves de mollusques et de proies vivantes de poissons d'aquaculture dans la plupart des écloseries produisant des juvéniles de ces espèces. La solution d'enrichissement de Conway (SEC), élaborée en 1966 par Walne, est largement utilisée pour la production de T-iso en batch. Cependant, les apports nutritifs de cette solution d'enrichissement ne sont pas spécifiquement optimisés pour la culture de cette algue, participant à engendrer des coûts de production élevés (Valenzuala-Espinoza *et al.*, 1999 ; Fabregas *et al.*, 1986) et des effluents inépuisés.

Dans les 15 dernières années, plusieurs auteurs sont parvenus à réduire le coût de solutions d'enrichissement pour les microalgues, par l'utilisation de solutions organiques d'origine animale ou végétale, d'engrais agricoles (Fabregas *et al.*, 1987) ou bien de sels de qualité "réactif". Une approche alternative, non exclusive de la première, consiste à optimiser la formulation des solutions d'enrichissement, pour chaque espèce cultivée. Cette solution devrait permettre, en outre, de diminuer la concentration des effluents de cultures d'algues.

L'objectif de cette étude est d'élaborer, sur la base de la SEC, un enrichissement de composition spécifiquement adaptée aux besoins physiologiques de T-iso, pour les productions en batch. La mise au point de cette nouvelle formulation repose sur trois axes principaux :

- Détermination du seuil de toxicité de la SEC
- Détermination du mode de calcul des apports de nutriments, en fonction de la population cellulaire ou en concentration de substrat
- Caractérisation de la nature et des apports relatifs des éléments optimisant la croissance des cultures en batch de T-iso.

Dans un premier temps, la démarche d'optimisation du milieu de culture de T-iso est conduite selon une approche quantitative de la biomasse. L'optimisation de la qualité biochimique des cellules produites ne pourra être envisagée qu'après une définition précise des besoins nutritifs des animaux consommateurs.

2 Matériels et Méthodes

Les cultures expérimentales ont été réalisées sur une souche de T-iso, acquise auprès de la station d'Argenton en 1998 et conservée depuis au laboratoire PBA. Les inoculums sont issus d'une culture en continu possédant les caractéristiques suivantes:

- température : $27,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- intensité lumineuse incidente : $120 \mu\text{mol.phot.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
- pH régulé à $7,20 \pm 0,05$
- rotation de la turbine : 120 tpm
- enrichissement : SEC standard
- taux de dilution : $0,33 \text{ j}^{-1}$
- concentration cellulaire : $19.10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$

L'eau de mer synthétique Reef Crystals® a été retenue dans le cadre des expériences et utilisée à raison de 38,2 g par litre d'eau distillée. Selon les niveaux d'enrichissement en SEC, le pH est ajusté à 7,5, à l'aide de solutions de HCl (0,01 N) ou de NaOH (0,32 N) selon les cas.

Les cultures sont réalisées en erlenmeyer de 250 ml, placés dans un incubateur New Brunswick Scientific G25, régulé à 26°C . La vitesse du plateau d'agitation est réglée à 190 tpm. L'intensité lumineuse mesurée à l'aide d'un capteur U190-SA, à l'intérieur de l'incubateur, est comprise entre 70 et $83 \mu\text{mol.phot m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figure 1).

L'évolution de la biomasse est suivie par numération cellulaire, les faibles volumes expérimentaux (de l'ordre de 150 ml) ne permettant pas la mesure de la matière sèche. La technique de numération utilise une chaîne d'analyse d'image, couplée au logiciel SAMBA. L'application utilisée a été développée par Le Déan et al (1991). Le résultat des comptages correspond à la moyenne des 10 champs et tient compte de la surface du champ analysé et du facteur de dilution choisi. Il est exprimé en nombre de cellules par ml de culture et est précisé par l'erreur standard. Le coefficient de variation, lié à l'ensemble des étapes (échantillonnage, dilution, dépôt sur lame, etc.) de cette méthode de numération est inférieur à 6%.

L'analyse d'image permet également de décrire des critères morphologiques des cellules. Le facteur de forme est utilisé en fin d'étude pour comparer la morphométrie des cellules cultivées sur différents enrichissement. Il est calculé par la formule suivante :

$$FF = \frac{P^2}{4.\pi.S}$$

avec : FF : Facteur de forme
 P : Périmètre
 S : Surface

Le facteur de forme est minimal (et égal à 1) pour un cercle et augmente avec la complexité de l'objet.

Le taux spécifique de croissance initial, caractérisant la vitesse de division cellulaire est défini par la formule suivante :

$$\mu = \frac{dX}{XdT}$$

et par intégration :

$$\mu = \frac{\text{Ln}(X) - \text{Ln}(X_0)}{T - T_0}$$

où : X : biomasse au temps T
X₀ : biomasse au temps T₀.

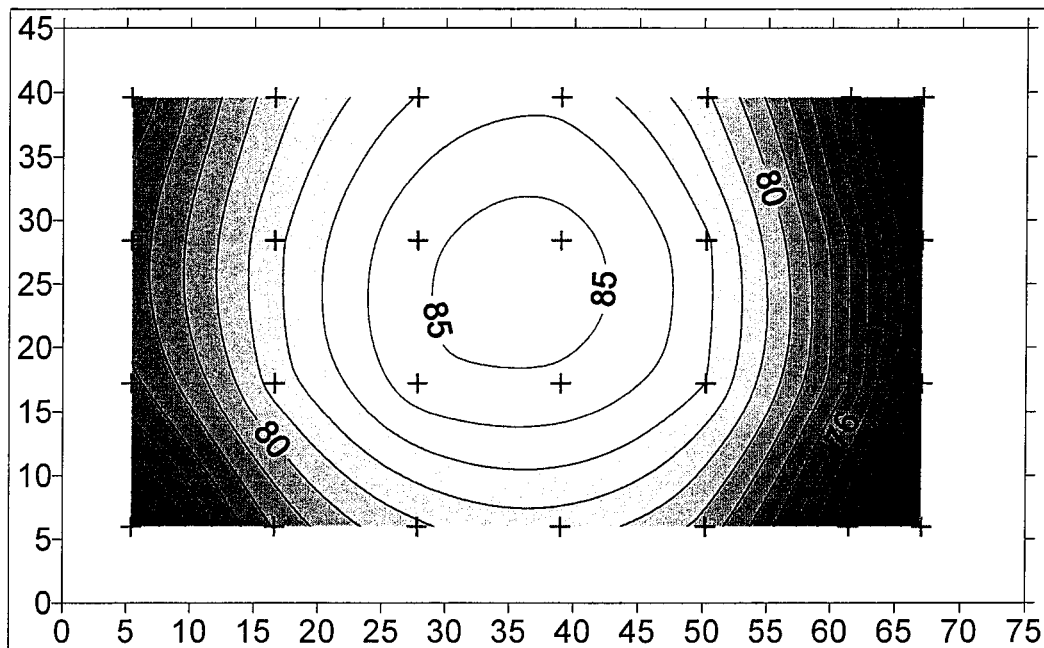


Figure 1. Cartographie de l'intensité lumineuse dans l'incubateur New Brunswick Scientific G25, exprimée en $\mu\text{mol phot. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

L'intensité lumineuse utilisée dans les conditions expérimentales impose rapidement une limitation de la vitesse de croissance des cultures. La disponibilité des nutriments demeure cependant le facteur prépondérant dans l'explication de la biomasse produite au terme des expériences. Ainsi, malgré l'existence de la limitation par la lumière, les conditions expérimentales utilisées permettent de comparer les performances liées à différents enrichissements.

Afin de mettre toutes les cultures dans les mêmes conditions d'éclairement, l'emplacement des erlenmeyers dans l'incubateur est interchangé quotidiennement et de façon aléatoire.

3 Résultats et discussion

3.1 Recherche du seuil de toxicité de la SEC

L'objectif de cette première expérience est de déterminer le seuil de toxicité de la SEC pour T-iso. Des concentrations croissantes de SEC sont testées jusqu'à l'obtention d'une dégénérescence de la culture. Il est nécessaire dans un premier temps de définir quelques termes pour éviter toute ambiguïté :

Inhibition : ralentissement ou arrêt de la croissance sous l'effet d'un inhibiteur ; l'inhibition peut être levée si la concentration de l'inhibiteur diminue au-dessous du seuil d'inhibition.

Adaptation au milieu : ralentissement ou arrêt de la croissance dû à une modification du milieu ; la croissance reprend ensuite sans qu'aucune condition de culture n'ait changé.

Létalité : mort de cellules.

Toxicité : terme plus général caractérisé soit par une inhibition, soit par une létalité.

3.1.1 Protocole expérimental :

La croissance des cellules de T-iso est mesurée sur neuf concentrations croissantes de SEC (Tableau 1). Les cultures sont inoculées, en erlenmeyer, à une concentration de $0,5 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$, avec duplicat.

Tableau 1. Gamme de concentrations de SEC

Concentrations d'enrichissement en SEC (ml.L^{-1})								
0,3	0,5	1	2	4	8	16	32	64

3.1.2 Résultats et discussion :

4 comportements peuvent être aisément identifiés (Figure 2):

- le premier concerne les enrichissements C_1 , C_2 , C_4 , C_8 , en présence desquels les cultures ont une croissance significative (avec un gain final de concentration cellulaire d'un facteur 32).
- le second regroupe les concentrations $C_{0,3}$ et $C_{0,5}$ pour lesquelles la croissance ralentit au terme de 3,5 jours. Le gain final en densité cellulaire est d'un facteur 24.
- les concentrations C_{16} et C_{32} entraînent une inhibition de la croissance pendant le premier jour de culture.
- Enfin, l'enrichissement C_{64} provoque une diminution continue du nombre de cellules.

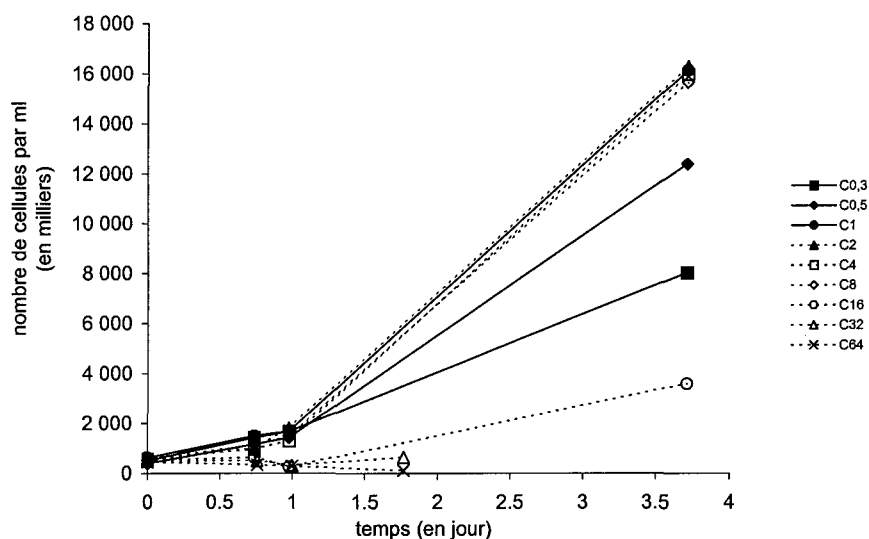


Figure 2. Evolution des concentrations cellulaires en présence de 9 concentrations différentes de SEC.

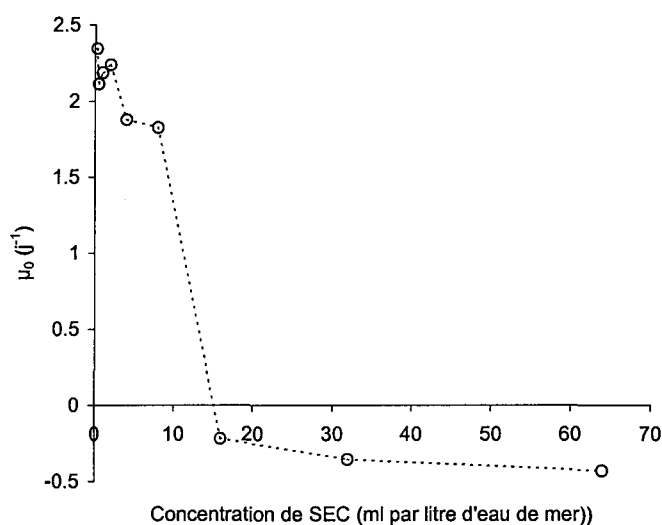


Figure 3. Taux spécifique de croissance initial (μ_0) en fonction de la concentration en SEC

Cette première expérience montre que, dans ces conditions expérimentales, l'enrichissement C_1 n'est pas toxique car les croissances initiales obtenues avec les concentrations d'enrichissement inférieures $C_{0,3}$ et $C_{0,5}$ ne sont pas supérieures à celles relevées en présence de C_1 . Les concentrations $C_{0,3}$ et $C_{0,5}$ se révèlent rapidement limitantes pour la croissance.

En terme de productivité, les résultats obtenus pour C_8 sont comparables à ceux de C_1 , C_2 et C_4 . A C_8 , la toxicité n'est donc toujours pas atteinte. Fabregas *et al.* (1985) ont montré, sur un milieu de culture de composition différente, que les conditions optimales de croissance de *Isochrysis galbana* sont obtenues, pour une salinité comprise entre 15 et 35 ‰, avec un enrichissement de 2, 4 ou 8 mM de NaNO_3 (à titre de comparaison, C_8 contient 9,4 mM de NaNO_3).

En présence de la concentration C_{16} (18.8 mM de NaNO_3), la population cellulaire diminue pendant les premières heures de culture, ce qui se traduit par une vitesse de croissance initiale

négative ($\mu_0 = -0.2$) (Figure 3). Cet enrichissement présente donc un effet toxique. Cependant, la concentration cellulaire augmente au terme du premier jour, indiquant que cette toxicité est soit une inhibition soit une adaptation au milieu. La levée de toxicité peut être la conséquence de la consommation du ou des nutriments inhibiteur(s) ou d'une longue phase d'adaptation à ce milieu riche en nutriments. Fabregas *et al.* (1985) ont également mis en évidence une diminution de la production cellulaire pour des concentrations en NaNO_3 supérieures à 16 mM.

A C_{32} , le nombre de cellules se maintient le premier jour. Au terme de 1,8 jour, la population augmente légèrement. A cette concentration, la toxicité n'est pas létale, mais de même nature que pour C_{16} .

La concentration C_{64} semble présenter une toxicité létale : en un jour, la concentration cellulaire diminue de moitié. Au bout de deux jours, quelques cellules demeurent visibles au microscope, mais leur aspect indique qu'elles sont en phase de dégénérescence. Les capacités d'adaptation des cellules sont dépassées. Cette toxicité peut être liée à la trop grande concentration en nutriments (toxicité chimique) ou à la présence de précipités emprisonnant les cellules (toxicité mécanique). Il est important de noter que l'adjonction indispensable de NaOH pour ajuster le pH à 7,2 entraîne la formation de précipités. Plus la concentration de SEC est forte, plus le précipité est important (le précipité apparaît à partir de la concentration C_{16}). Une observation du milieu au microscope permet de mettre en évidence que les cellules se retrouvent emprisonnées dans le précipité.

Les résultats montrent que, lorsque l'enrichissement en nutriments augmente, le taux de croissance initial μ_0 tend à diminuer (Figure 3) : avec une concentration C_2 , μ_0 est légèrement supérieur à 2, alors qu'avec C_{16} il est proche de zéro et négatif pour C_{64} . Ce phénomène est à relier à la nécessité, pour les cellules, de s'adapter au brusque changement de concentrations en nutriments, lors de l'inoculation dans les conditions expérimentales.

Cette expérience permet de situer le seuil de toxicité de la SEC à une concentration comprise entre 8 et 16 fois sa concentration standard.

3.2 Détermination du mode d'expression de la toxicité

L'objectif de cette expérience est de vérifier si la toxicité létale de la SEC est dépendante de la concentration en nutriments ou de la dose disponible par cellule. L'indice R_x , représentant le rapport entre la concentration de la SEC et la concentration cellulaire initiale, est construit afin de traduire la disponibilité du substrat par cellule. Le rapport de référence R_1 correspond à l'apport de 1 mL.L^{-1} de SEC, en présence d'une concentration cellulaire initiale de $5.10^5 \text{ cell.ml}^{-1}$.

3.2.1 Protocole expérimental :

Expérience 2a :

La concentration C_{64} est testée en présence de 5 concentrations cellulaires initiales différentes de manière à ce que le rapport R_x couvre une large gamme, comprise entre R_2 et R_{64} (Tableau 2). Chaque condition est dupliquée.

Tableau 2. Concentrations cellulaires initiales et rapport R_x correspondant

Concentration cellulaire initiale (ml^{-1})	R_x^*
5.10^5	64
10^6	32
2.10^6	16
4.10^6	8
6.10^6	2

Expérience 2b :

Les concentrations C_{32} et C_{16} sont testées dans un deuxième temps. En effet, les résultats obtenus avec C_{64} indiquent qu'il n'est pas nécessaire d'explorer une gamme de concentrations cellulaires pour ces niveaux d'enrichissement, les densités extrêmes permettant, à elles seules, de déterminer si C_{32} et C_{16} sont des concentrations létales ou inhibitrices. Chacune des conditions est répliquée.

Les concentrations cellulaires initiales testées sont :

- C_{32} : 18.10^6 cellules. ml^{-1} et 5.10^5 cellules. ml^{-1} .
- C_{16} : 19.10^6 cellules. ml^{-1} et 5.10^5 cellules. ml^{-1} .

3.2.2 Résultats et discussion :

A la concentration C_{64} (Figure 4), quel que soit le nombre initial de cellules, il y a dégénérescence de la culture. La concentration cellulaire est divisée, en moyenne, par 2 pour toutes les concentrations cellulaires initiales. Avec la concentration C_{32} , la même tendance est observée (Figure 5), la population étant divisée par 2 au bout de deux jours, à partir d'un inoculum de 18.10^6 cell. ml^{-1} . Pour les essais inoculés à 5.10^5 cell. ml^{-1} , la population semble stable.

Pour C_{16} , durant les 24 premières heures, les courbes ont le même profil qu'en présence de C_{32} : la population décroît en présence d'une densité initiale proche de 20.10^6 cell. ml^{-1} mais reste stable pour la culture inoculée à 5.10^5 cell. ml^{-1} (Figure 6). Au terme du premier jour, une reprise de la croissance est notable.

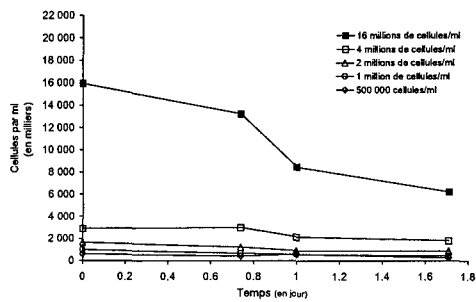


Figure 4. Exp 2a : suivi de 5 concentrations cellulaires initiales différentes en présence d'un apport C₆₄.

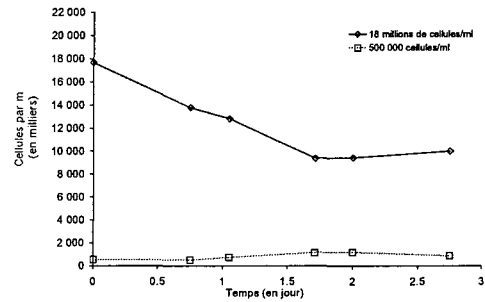


Figure 5. Exp 2b : suivi de 2 concentrations cellulaires initiales différentes en présence d'un apport C₃₂.

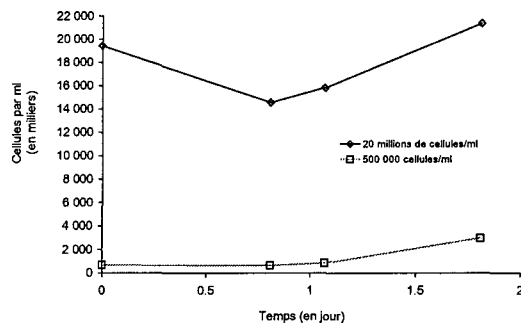


Figure 6. Exp 2 : suivi de 2 concentrations cellulaires initiales différentes en présence d'un apport C₁₆.

Sur la base de l'enrichissement C₆₄ (Expérience 2a), la concentration de cellules inoculées varie de manière à ce que le rapport R_x couvre une gamme comprise entre R₂ et R₆₄. Les résultats confirment la toxicité de la concentration C₆₄, quelle que soit la valeur du rapport R_x. Il est ainsi démontré que le phénomène de toxicité, lié à l'enrichissement du milieu, dépend directement de la concentration de l'enrichissement. A court terme, c'est à dire sans consommation significative des nutriments, la densité de la population cellulaire initiale n'a pas d'influence sur l'expression de la létalité. La toxicité du milieu doit donc être raisonnée en fonction d'un seuil de toxicité et non pas en fonction de la densité cellulaire.

Le deuxième objectif de cette expérience est d'affiner la détermination du seuil de toxicité de la SEC pour T-iso. D'après les figures 6, 7 et 8, les trois concentrations de SEC testées apparaissent toxiques, mais à des degrés différents :

- avec l'enrichissement C₆₄, 50 % de la population initiale disparaissent au terme du premier jour de culture
- pour C₃₂ et C₁₆, seulement 25 % de la population initiale disparaissent au terme du premier jour de culture. Cependant, avec l'enrichissement C₁₆, l'inhibition est levée au terme du premier jour : la population augmente quelle que soit la densité cellulaire initiale. Pour C₃₂, la population se stabilise à partir de 1,7 jour : il n'y a donc pas levée de l'inhibition mais modification de l'effet toxique de la SEC.

Dans des conditions de culture données, il existe un seuil de concentration de substrat au-delà duquel la toxicité se manifeste sur la population. L'expression de cette toxicité est

indépendante de la densité de la population cellulaire. Les résultats confirment que la toxicité de la SEC apparaît pour des enrichissements compris entre 8 et 16 fois la concentration standard.

3.3 Détermination de la logique d'enrichissement en nutriments

Les expériences précédentes ont montré que, pour la culture de T-iso en batch et dans ces conditions expérimentales, la concentration de SEC peut être augmentée d'un facteur 8, par rapport à la dose standard, sans induire de toxicité. Dans le cadre de l'expérience 1 (§ 3.1), les concentrations de SEC, dites " non toxiques ", ont été testées sur un temps de culture trop court pour atteindre la phase stationnaire, ne permettant pas d'évaluer le potentiel de production de chacune des concentrations de SEC.

L'objectif de cette expérience est d'identifier le mode d'administration des nutriments. Comme pour la toxicité, il s'agit de déterminer si l'enrichissement doit être raisonné en fonction de la population cellulaire auquel il s'adresse ou en terme de concentration de substrat.

3.3.1 Protocole expérimental :

Dans cette expérience, les concentrations initiales en nutriments et en cellules varient respectivement entre $C_{0,5}$ et C_8 et $5.10^5 \text{ cell.ml}^{-1}$ et $6.10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$ (Tableau 3). Les conditions n'ont pas été dupliquées.

Tableau 3. Conditions testées dans le cadre de l'expérience 3. Chaque condition a été réalisée en un seul exemplaire.

		Concentration de nutriments			
		$C_{0,5}$	C_1	C_2	C_8
Concentration initiale de cellules (ml^{-1})	6.10^6	*	*	*	*
	$3,5.10^6$	*	*	*	*
	2.10^6	*	*	*	*
	5.10^5	*	*	*	*

3.3.2 Résultats et discussion :

En présence des concentrations $C_{0,5}$, C_1 et C_2 les cinétiques de croissance sont comparables, quelle que soit la densité cellulaire initiale, (Figure 7) :

- avec une concentration $C_{0,5}$, la population, en phase plateau, est comprise entre 12 et $20.10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$.
- avec une concentration C_1 , la population cellulaire maximale est comprise entre 20 et $30.10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$.
- avec une concentration C_2 , la densité cellulaire maximale obtenue est de 30 à $40.10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$.

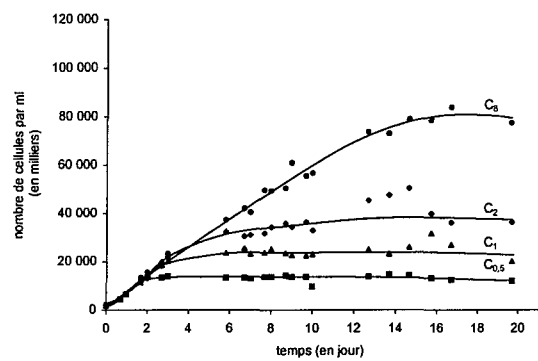
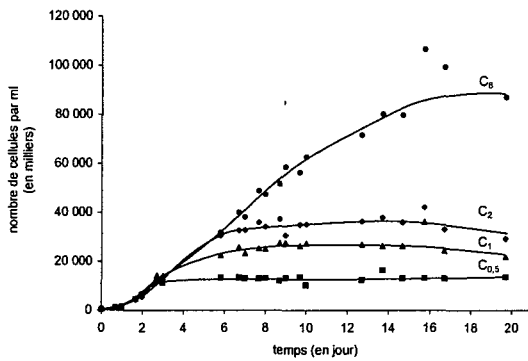
Il est intéressant de noter qu'avec la concentration C_8 , le gain cellulaire le plus important est obtenu avec la concentration cellulaire initiale la plus faible :

- $90.10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$ avec $5.10^5 \text{ cell.ml}^{-1}$ initiales

- $80 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$ avec $2 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$ initiales
- $70 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$ avec $3,5 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$ initiales
- $70 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$ avec $6 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$ initiales

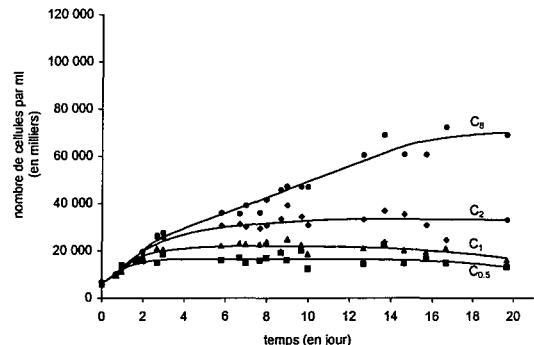
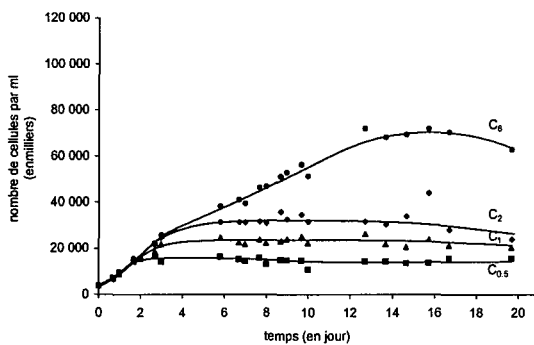
La Figure 7 indique que la production cellulaire est d'autant plus élevée que l'enrichissement est important, dans la limite de l'apparition de la toxicité de la SEC (§ 3.2). Contrairement à la biomasse finale, le taux de croissance spécifique initial (μ_0) n'est pas modifié par la quantité initiale de nutriments (Tableau 4). Ces résultats sont tout à fait représentatifs des phénomènes de limitation nutritive décrits par Richmond (1986) : vitesses initiales identiques puis étagement selon la concentration initiale de l'élément limitant.

La Figure 8 indique en revanche une relation linéaire entre μ_0 et la population cellulaire initiale. La valeur maximale de μ_0 est obtenue pour l'inoculum le plus faible ($5 \cdot 10^5 \text{ cell.ml}^{-1}$). De même, pour l'enrichissement C_8 avec un inoculum de $5 \cdot 10^5 \text{ cell.ml}^{-1}$, la population cellulaire atteint environ $90 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$ alors qu'un inoculum de $6 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$ ne permet pas de dépasser $70 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$. Cette dépendance entre μ_0 et la densité cellulaire initiale peut être expliquée, au moins partiellement, par l'auto-ombrage.



Concentration cellulaire initiale : $0,5 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$

Concentration cellulaire initiale : $2 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$



Concentration cellulaire initiale : $3,5 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$

Concentration cellulaire initiale : $6 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$

Figure 7. Courbes de croissance de *T-iso*, en présence de 4 concentrations différentes de SEC ($C_{0,5}$, C_1 , C_2 et C_8) et pour 4 niveaux d'inoculum différents ($0,5 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^6$, $3,5 \cdot 10^6$ et $6 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$).

Tableau 4. Taux de croissance spécifique initial μ_0 (j^{-1}) et rapport R_x .

		Concentration de la SEC				
		$C_{0,5}$	C_1	C_2	C_8	
concentration initiale de cellules (ml^{-1})	$6,0 \cdot 10^6$	R_x	0,042	0,083	0,167	0,667
		μ_0	0,6	0,6	0,6	0,6
	$3,5 \cdot 10^6$	R_x	0,070	0,143	0,290	1,143
		μ_0	0,9	0,9	0,9	0,9
	$2,0 \cdot 10^6$	R_x	0,125	0,250	0,500	2,000
		μ_0	1,2	1,2	1,2	1,2
	$0,5 \cdot 10^6$	R_x	0,500	1,000	2,000	8,000
		μ_0	1,4	1,4	1,4	1,4

Le Tableau 4 révèle l'absence de relation entre μ_0 et R_x . Pour des valeurs proches ou identiques de ce rapport, μ_0 peut être très différent. L'indépendance de ces deux paramètres prouve que la disponibilité des nutriments (en dehors des conditions de limitation) ne gouverne pas la croissance cellulaire. Cette conclusion a des conséquences directes sur l'établissement des protocoles de production puisque, comme la toxicité, l'enrichissement d'une culture en nutriments doit être raisonné en terme de concentration de nutriments et non pas en fonction de la population cellulaire.

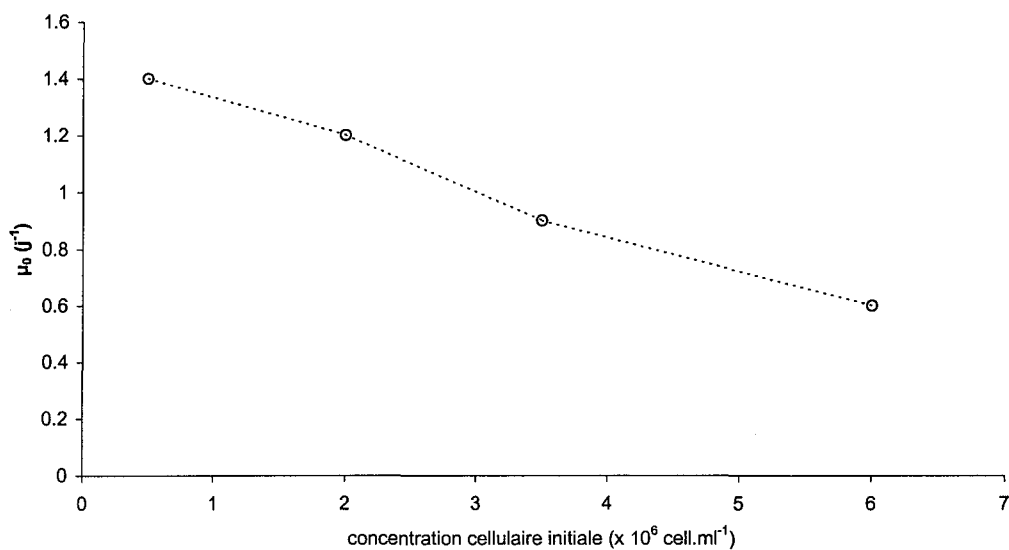


Figure 8. Evolution du taux de croissance spécifique initial (μ_0), en fonction de la concentration initiale de cellules.

Sous ces conditions expérimentales, la concentration standard de SEC ne permet pas d'entretenir une croissance forte au-delà de trois jours de culture en batch. Après ce délai, le milieu est carencé en un ou plusieurs éléments. Il serait donc intéressant de déterminer l'origine de la limitation et de vérifier si l'équilibre entre les éléments constituant la SEC est optimum.

3.4 Influence de concentrations variables de la solution principale de l'enrichissement de Conway

L'expérience précédente a permis d'évaluer les potentialités nutritives de la SEC. Il semble, d'après la littérature (Fabregas, 1985 ; Miner, 1998), que l'on peut attribuer l'important gain en croissance cellulaire obtenu avec la concentration C_8 à l'augmentation de la concentration de certains composés de la solution principale du milieu nutritif.

3.4.1 Protocole expérimental :

Dans cette expérience, une concentration de solution principale multipliée par un facteur 8 (CSP_8) est testée afin d'observer si la production cellulaire obtenue est identique à celle observée avec l'enrichissement C_8 . Afin de vérifier si ce rapport de 8 entre la solution principale et les deux autres solutions perturbe la croissance cellulaire, des rapport inférieurs sont également testés : $CSP_{0,5}$, CSP_1 (SEC standard), CSP_2 et CSP_4 (Tableau 5).

Les cultures sont inoculées à une densité de $0,5 \cdot 10^6$ cell.ml⁻¹. Chaque condition est dupliquée.

Tableau 5. Concentrations de Solution Principale testées dans le cadre de l'expérience 4

Concentration de Solution Principale (CSP) de l'enrichissement de Conway (ml.L ⁻¹)				
$CSP_{0,5}$	CSP_1	CSP_2	CSP_4	CSP_8
0,5	1	2	4	8

Dans tous les cas, les concentrations de métaux traces et de vitamines sont les suivantes :

- Métaux traces = $0,25$ ml.L⁻¹ (concentration de SEC standard)
- Vitamines = $0,05$ ml.L⁻¹ (concentration de SEC standard).

3.4.2 Résultats et discussion :

La Figure 9 montre que les 5 enrichissements permettent d'obtenir des résultats différents en terme de concentration cellulaire:

- La concentration $CSP_{0,5}$ permet d'atteindre $15 \cdot 10^6$ cell.ml⁻¹.
- Avec une concentration CSP_1 , la densité cellulaire maximale est de $25 \cdot 10^6$ cell.ml⁻¹.
- L'enrichissement CSP_2 permet d'atteindre un seuil de l'ordre de $50 \cdot 10^6$ cell.ml⁻¹.
- Avec CSP_4 , la concentration cellulaire maximale atteint $75 \cdot 10^6$ cell.ml⁻¹.
- En présence de l'enrichissement CSP_8 , la population cellulaire atteint $110 \cdot 10^6$ cell.ml⁻¹.

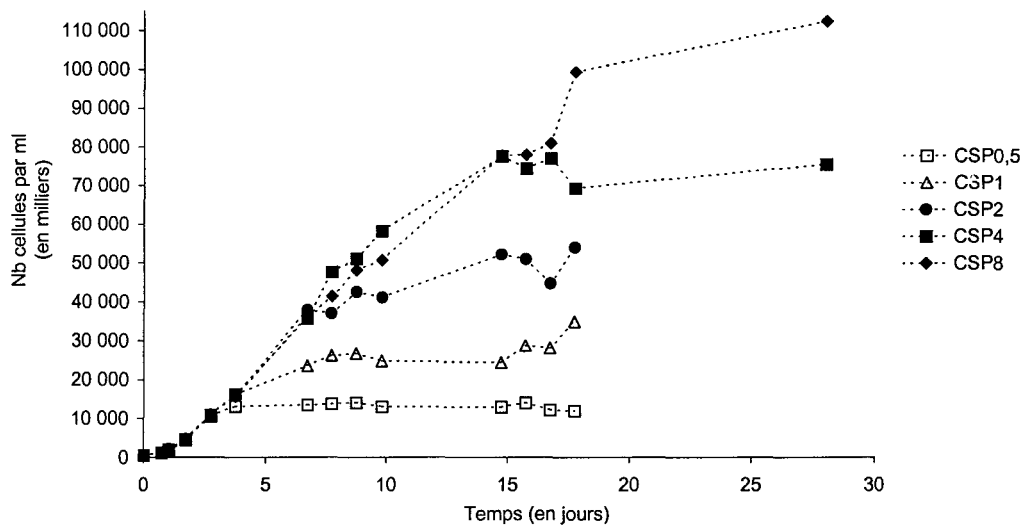


Figure 9. Courbes de croissance, en présence de 5 concentrations différentes de solution principale de l'enrichissement de Conway pour une population cellulaire initiale de $0,5 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$.

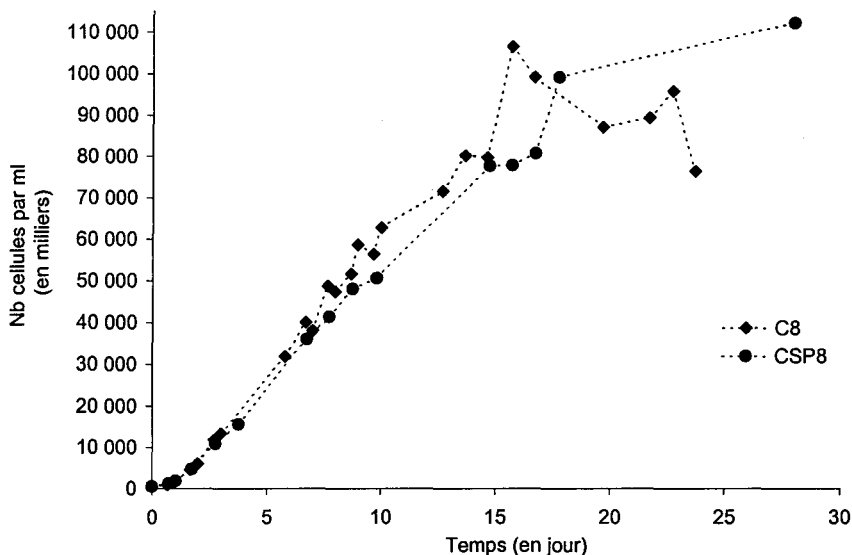


Figure 10. Comparaison des croissances sur les milieux de culture C_8 et CSP_8 .

Comme dans l'expérience 3 (§ 3.3), les cinétiques montrent que, quel que soit la concentration d'enrichissement, la vitesse initiale des cultures est identique ($\mu_0 = 1,1$). Les cultures possèdent des cinétiques de croissance comparables, que l'on augmente la concentration des trois solutions composant la SEC (Figure 7) ou uniquement la concentration de la solution principale (Figure 9).

Une analyse de covariance entre les solutions nutritives C_8 et CSP_8 indique qu'au risque 5%, il n'y a pas de différence significative entre les deux enrichissements ($t_{0,95} > 1,714$). La multiplication par 8 de la concentration de la solution principale suffit donc, à elle seule, pour obtenir la même biomasse finale que celle obtenue avec C_8 (Figure 10). Par ailleurs, le rapport élevé entre la solution principale et les solutions de métaux traces et de vitamines n'entraîne pas de perturbation au niveau de la croissance. L'apport en métaux traces et vitamines de la

SEC (relativement à l'apport de la solution principale) n'est donc pas limitant pour la croissance. Il est possible de diminuer cet apport d'un facteur 8, toujours relativement à l'apport de la solution principale. Il est indispensable de souligner que ces résultats ont été obtenus sur une eau de mer synthétique, dont la composition peut palier aux faibles apports de métaux traces.

On peut dès lors conclure que :

- le ou les élément(s) responsable(s) de l'augmentation de la densité cellulaire est (ou sont) contenu(s) dans la solution principale de l'enrichissement de Conway. Il reste à le (ou les) identifier.
- les métaux traces et les vitamines sont surdosés dans la SEC standard (minimum facteur 8) pour la culture de T-iso en batch.

3.5 Influence de la concentration de NaNO_3 de la solution principale

Les résultats précédents ont montré que l'augmentation de la concentration de la solution principale de l'enrichissement de Conway est responsable du gain cellulaire observé avec l'enrichissement C_8 . Il est nécessaire de déterminer quels éléments de cette solution principale sont impliqués dans l'apparition de la limitation à concentration standard (C_1).

D'après Bougaran *et al.* (2000), les nitrates sont consommés rapidement par T-iso. Dans des cultures discontinues, inoculées à $0,5 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$ en photobioréacteurs de 2 litres, ils disparaissent totalement au bout de trois jours. De même, Fabregas *et al.* (1985) ont montré que les meilleures croissances d'*Isochrysis galbana* sont observées avec 2, 4 ou 8 mM de NaNO_3 pour des salinités de 15 à 35 ‰. Dans la SEC standard, la concentration molaire de NaNO_3 n'est que de 1.18 mM. Ces résultats semblent indiquer que la SEC standard ne contient pas suffisamment de nitrates pour permettre de dépasser la concentration cellulaire de $25 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$ (maximum atteint avec la SEC standard).

3.5.1 Protocole expérimental :

Afin de mettre en évidence le rôle des nitrates dans la limitation de la croissance, deux types d'enrichissement (CN_1 et CN_8) sont comparés à un apport C_8 (Tableau 6). Les cultures sont inoculées à une densité de $0,5 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$. Chaque condition est dupliquée.

Tableau 6. Concentrations testées dans le cadre de l'expérience 5

	Enrichissement
CN ₁	Concentration en NaNO ₃ *1 Concentration en Solution principale sans NaNO ₃ : *1 Concentration en Métaux traces*1 Concentration en Vitamines*1
CN ₈	Concentration en NaNO ₃ *8 Concentration en Solution principale sans NaNO ₃ : *1 Concentration en Métaux traces*1 Concentration en Vitamines*1
C ₈	Concentration en NaNO ₃ *8 Concentration en Solution principale sans NaNO ₃ : *8 Concentration en Métaux traces*8 Concentration en Vitamines*8

3.5.2 Résultats et discussion :

Les courbes de croissances obtenues pour les différents types d'enrichissement sont présentées sur la Figure 11. Comme pour C₁ dans l'expérience 3 (§ 3.3), la concentration cellulaire obtenue avec la concentration CN₁ se stabilise à 20.10^6 cell.ml⁻¹ à partir du quatrième jour.

L'apport de NaNO₃ à la concentration CN₈ et l'enrichissement C₈ permettent des productions variant entre 60 et 100.10^6 cell.ml⁻¹. Une analyse de covariance, au risque 5 %, indique une différence statistiquement significative entre les deux modes de nutrition ($t = 2.677$; $P < 0.01$). L'apport de NaNO₃ à la concentration CN₈ ne permet donc pas une production cellulaire aussi élevée que celle obtenue avec un enrichissement C₈. De plus, les cellules cultivées sur enrichissement CN₈ apparaissent plus allongées que celles obtenues avec C₈ (Figure 12). La réalisation d'un test de comparaison des moyennes du facteur de forme des cellules cultivées sur enrichissements C₈ et CN₈ permet de confirmer qu'il y a bien, au seuil de 5 %, une différence de forme entre les cellules ($t_c = 4.478 > 1.943$).

Il ressort de ces résultats que la multiplication par 8 de la quantité de nitrates (CN₈) doit être associée à l'augmentation de la concentration d'un (ou plusieurs) autre(s) élément(s) de la solution principale de l'enrichissement de Conway, afin d'obtenir des performances identiques à celles atteintes en enrichissement CSP₈.

La nécessité d'augmenter la concentration en nitrates du milieu nutritif était prévisible. En effet, après le carbone, l'azote constitue l'élément le plus important composant la matière sèche de l'algue. Il participe aussi au métabolisme des algues. Une carence en nitrates entraîne une diminution de la quantité de pigments photosynthétiques (Herzig, 1989) et un ralentissement (ou l'arrêt) de la photosynthèse (Flynn, 1993). Il est donc important de couvrir les besoins cellulaires en nitrates.

Il est également nécessaire que l'apport en nitrates soit complété par celui de certains éléments de la solution principale qui contribuent à la réduction des nitrates et au métabolisme des composés azotés. C'est le cas du fer (Morel *and al.*, 1991 ; Raven, 1988) et des phosphates.

Un ou plusieurs de ces éléments sont donc en quantité insuffisante dans l'enrichissement CN₈. Il s'agit désormais d'identifier cet (ou ces) élément(s) et d'en rechercher la concentration relative optimale.

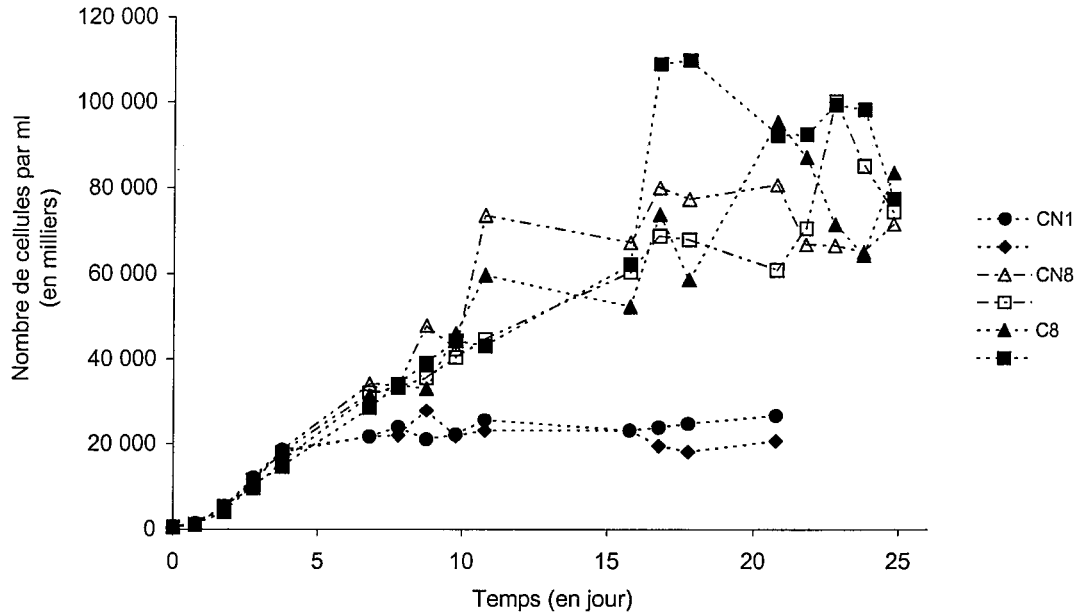


Figure 11. Courbes de croissance, sur 3 milieux de culture différents : CN₁, CN₈ et C₈.

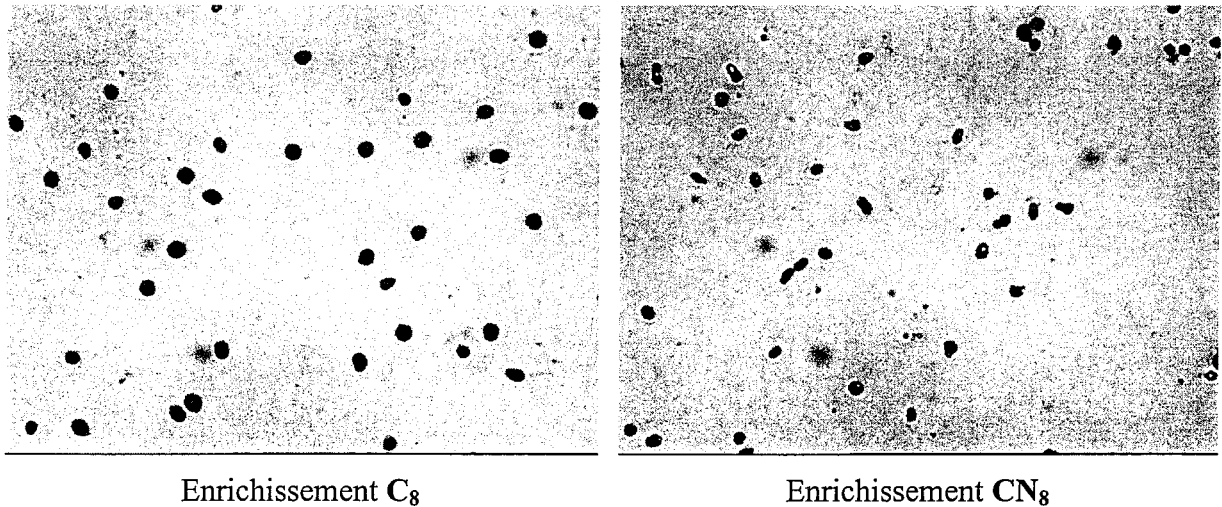


Figure 12. Comparaison de la morphologie des cellules cultivées sur enrichissements C₈ et CN₈. (cellules fixées au lugol. $\times 100$).

3.6 Influence de la concentration de NaH₂PO₄ de la solution principale

La multiplication par 8 de l'apport en NaNO₃, bien que permettant d'obtenir une concentration cellulaire très supérieure à celle obtenue avec la SEC standard, ne permet pas d'atteindre les performances d'un enrichissement CSP₈. Sathi et al (1993) ont montré qu'une baisse de la disponibilité en phosphore entraîne une diminution de la quantité de protéines, de chlorophylle a, de RNA et de DNA du phytoplancton. La concentration de cet élément majeur

peut donc ralentir la réaction de photosynthèse et influencer la production cellulaire finale. D'après Decobecq (1999), les éléments majeurs, nitrates et phosphates, influencent la croissance cellulaire de T-iso. Pour une même concentration en nitrates, les croissances cellulaires semblent être favorisées par des concentration initiales en phosphate plus élevées (rapport N/P de l'ordre de 0,7 à 21,9).

Dans le cadre de l'expérience 5 (§ 3.5), l'augmentation de la concentration en nitrates a induit des modifications importantes du rapport N/P du milieu de culture (de 7,1 à 56,5). Dans cette expérience, une gamme de concentrations de NaH_2PO_4 est explorée, tout en conservant la concentration optimale de NaNO_3 précédemment obtenue (9,44 mM).

3.6.1 Protocole expérimental :

La gamme de concentration de NaH_2PO_4 permet d'explorer des valeurs de rapport N/P variant de 7 à 56 (Tableau 7). L'ensemble des conditions expérimentales est comparée au témoin constitué par la solution d'enrichissement C_8 . Les cultures sont inoculées à une densité de $0,5 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$. Chaque condition a été dupliquée.

Tableau 7. Concentrations testées dans le cadre de l'expérience 6

Essai	Enrichissement
CN_8P_1	Concentration en NaH_2PO_4 *1 Concentration en NaNO_3 *8 Concentration en Solution Principale sans NaH_2PO_4 et sans NaNO_3 : *1 Concentration en Métaux traces*1 Concentration en Vitamines*1
CN_8P_2	Concentration en NaH_2PO_4 *2 Concentration en NaNO_3 *8 Concentration en Solution Principale sans NaH_2PO_4 et sans NaNO_3 : *1 Concentration en Métaux traces*1 Concentration en Vitamines*1
CN_8P_4	Concentration en NaH_2PO_4 *4 Concentration en NaNO_3 *8 Concentration en Solution Principale sans NaH_2PO_4 et sans NaNO_3 : *1 Concentration en Métaux traces*1 Concentration en Vitamines*1
CN_8P_8	Concentration en NaH_2PO_4 *8 Concentration en NaNO_3 *8 Concentration en Solution Principale sans NaH_2PO_4 et sans NaNO_3 : *1 Concentration en Métaux traces*1 Concentration en Vitamines*1
C_8	Concentration en NaH_2PO_4 *8 Concentration en NaNO_3 *8 Concentration en Solution Principale sans NaH_2PO_4 et sans NaNO_3 : *8 Concentration en Métaux traces*8 Concentration en Vitamines*8

3.6.2 Résultats et discussion :

Il semble, qu'en terme de concentration cellulaire, il n'y a pas de différence notable entre les quatre essais : les concentrations CN_8P_1 , CN_8P_2 , CN_8P_4 et CN_8P_8 permettent d'atteindre des densités cellulaires de l'ordre de $60 \text{ à } 80 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$. Le témoin, C_8 , permet d'obtenir une concentration cellulaire maximale supérieure aux autres concentrations testées (environ $90 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$).

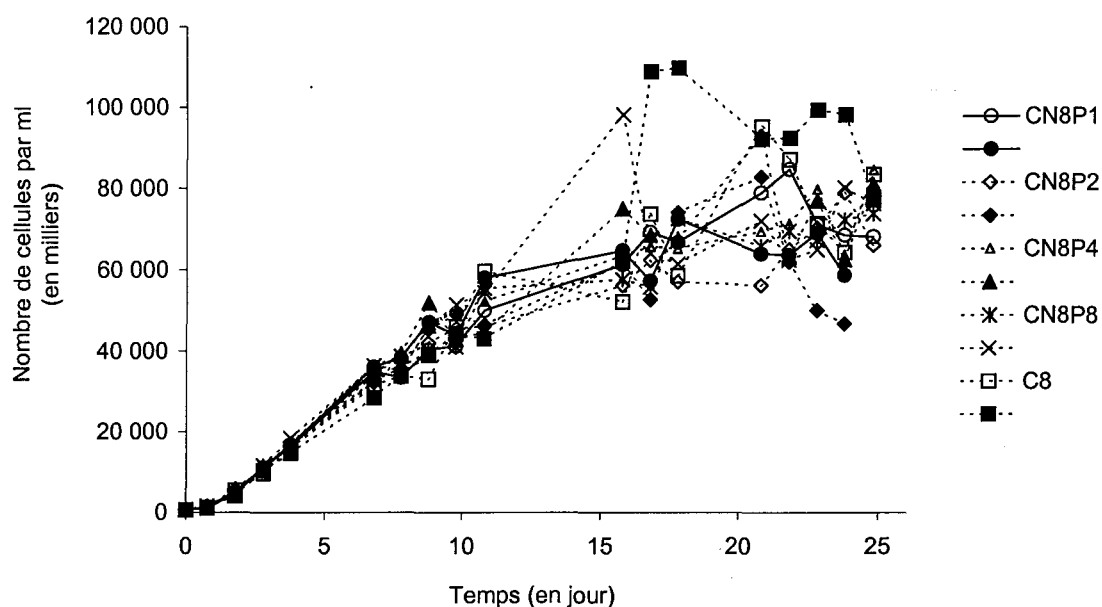


Figure 13. Evolution des concentrations cellulaires en fonction du temps sur 5 milieux nutritifs différents : CN_8P_1 , CN_8P_2 , CN_8P_4 et CN_8P_8 et C_8 .

L'observation microscopique des cellules montre des différences morphologiques entre les essais : les algues cultivées sur enrichissement CN_8P_1 et CN_8P_2 sont plus petites, plus claires et de forme plus allongée que celles obtenues avec le témoin C_8 et les deux autres enrichissements (CN_8P_4 et CN_8P_8). Ceci est confirmé par le test de comparaison des moyennes du facteur de forme obtenues avec CN_8P_1 et CN_8P_8 qui indique, au seuil de 5 %, une différence significative entre les deux essais ($t_c = 3.441 > 1.943$). Le même test, réalisé entre les cellules cultivées sur C_8 et CN_8P_8 , montre qu'au seuil de 5 %, il n'y a pas de différence morphométrique entre les cellules ($t_c = 1.685 < 1.943$). Il semble que les enrichissements CN_8P_1 et CN_8P_2 ont induit une carence en phosphate, sans conséquences sur les divisions cellulaires, mais qui se traduit par des modifications morphologiques qui pourraient être dues à un déséquilibre important du rapport N/P (Tableau 8).

Les enrichissements CN_8P_4 et CN_8P_8 permettent d'obtenir des concentrations cellulaires maximales équivalentes et des cellules de forme, de taille et de coloration identiques. Pour les différencier, il aurait été intéressant d'analyser la composition du milieu enrichi en CN_8P_8 en

phase plateau afin de déterminer si les phosphates sont encore présents dans le milieu. A défaut de résultats complémentaires, l'enrichissement CN_8P_8 semble devoir être retenu pour éviter d'être en présence d'un milieu carencé en phosphates. Cet enrichissement conserve le même rapport N/P que celui de la SEC standard déterminé par Walne (1966) qui ne semble pas induire de carence en phosphates (Tableau 8).

Tableau 8. Rapport N/P des différents enrichissements

Essai	Rapport N/P
C_1	7,06
CN_8P_1	56,52
CN_8P_2	28,26
CN_8P_4	14,13
CN_8P_8	7,06

Bien que les performances des enrichissements CN_8P_8 et CN_8P_4 soient supérieures à celles de la SEC standard, elles restent néanmoins inférieures à celles d'un apport nutritif C_8 ou CSP_8 . Ces résultats laissent donc penser que ces dernières formulations de la SEC sont carencées en un troisième élément de la solution principale. Il sera nécessaire de renouveler cette expérience en faisant varier la concentration d'un autre élément de la solution principale de l'enrichissement de Conway comme, par exemple, le fer. En effet, cet élément joue un rôle crucial dans le métabolisme du phytoplancton (Raven, 1988 ; Sunda, 1989 ; Morel *et al.*, 1991). Il joue un rôle de catalyseur dans la réaction de photosynthèse et celui de transporteur d'électrons dans la chaîne respiratoire (Raven, 1988) et dans la réduction des nitrates. Il est donc probable que l'apport de fer doit être augmenté conjointement à celui des nitrates et des phosphates.

3.7 Proposition d'une formulation d'enrichissement optimisée pour la culture en batch de T.ISO

Sur la base des enseignements acquis au terme des diverses expériences, il est désormais possible de proposer une formulation d'enrichissement spécifiquement adaptée à la culture en batch de T-iso (Tableau 9). Cette solution est établie sur la base d'un apport CN_8P_8 , ce qui signifie que les apports de N et P sont 8 fois plus importants que ceux de la SEC. Dans l'état actuel des connaissances, il paraît préférable de conserver un apport en vitamines.

Il est nécessaire de souligner que cette formulation est établie sur la base d'une eau de mer artificielle. Ce choix, dicté par le souci de répétabilité, impose cependant des restrictions quant à l'emploi de cette nouvelle formule sur des eaux naturelles. Il paraît indispensable de procéder au dosage des métaux traces dans l'eau Reef Crystals® pour déterminer la part d'apport de métaux par la base eau de mer, relativement à celle de l'enrichissement. Il sera ainsi possible de déterminer un apport global (eau de mer et enrichissement) qui pourra être appliqué à toute eau de mer, naturelle ou synthétique, dès lors que sa composition en métaux est connue.

Tableau 9. Formulation proposée pour l'enrichissement des cultures en batch de T-iso, sur eau de mer artificielle Reef Crystals®.

Produit	Concentration (mole/l)
Solution principale	
NaNO ₃	9,44.10 ⁻³
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	1,34.10 ⁻³
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	1,34.10 ⁻⁴
H ₃ BO ₃	5,42.10 ⁻⁴
FeCl ₃ , 6H ₂ O	4,83.10 ⁻⁶
MnCl ₂ , 4H ₂ O	1,83.10 ⁻⁶
Solution de Métaux traces	
ZnCl ₂	1,56.10 ⁻⁷
CoCl ₂ , 6H ₂ O	8,44.10 ⁻⁸
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	7,28.10 ⁻⁹
CuSO ₄ , 5H ₂ O	8,00.10 ⁻⁸
Solution de vitamines	
B1	2,96.10 ⁻⁷
B12	2,69.10 ⁻⁹

4 Conclusion

Les premières limitations occasionnées par différentes concentrations de SEC trouvent leur origine dans la solution principale. Deux éléments majeurs ont pu être identifiés : les nitrates (N) et les phosphates (P). L'augmentation de la concentration de ces deux éléments, d'un facteur 8, permet d'obtenir des productions cellulaires sensiblement supérieures à celles atteintes sur SEC standard. Cependant, cette formulation CN_8P_8 ne permet pas d'atteindre, en terme de densité cellulaire, les performances obtenues en multipliant par 8 la concentration de SEC standard (C_8) ou en multipliant par 8 globalement la concentration de la solution principale de l'enrichissement de Conway (CSP_8). Cette formulation (CN_8P_8) est donc, au minimum, carencée en un troisième élément de la solution principale qu'il sera nécessaire d'identifier pour établir la formulation optimale de la SEC pour la culture de T-iso en batch.

Il a été montré que l'équilibre entre les 3 solutions mères composant la SEC standard n'est pas optimum pour la culture de T-iso en batch. Provasoli (1958) et Kain *et al.* (1960) précisent que les vitamines B1 et B12 doivent être présentes dans le milieu pour permettre la croissance d'*Isochrysis galbana*. D'après Decobecq (1999), des cultures de T-iso, privées d'apport vitaminique, présentent pourtant des cinétiques de croissance identiques à celles relevées en présence de vitamines, en batch. Les résultats de cette étude indiquent que les solutions de métaux traces et de vitamines sont surdosées (au minimum d'un facteur 8) dans la SEC standard, associé à l'eau de mer Reef Crystals®. En batch, c'est à dire sur des cultures à court terme, il est donc possible de diminuer les concentrations de métaux traces et de vitamines par rapport à celle de la solution principale. Cependant, si les cellules puisent sur leurs réserves internes pour pallier aux carences, les performances ne pourront être maintenues dans le cadre d'une culture en continu. Il sera nécessaire de réaliser des cultures en continu, privées d'apport vitaminique afin de vérifier la nécessité de leur présence. La possibilité de diminuer l'apport de vitamines et de métaux traces présente un intérêt évident en terme de coût d'exploitation (Glize, 1994) et d'impact écologique, par la réduction de la concentration des effluents aquacoles.

Bibliographie

Bougaran G., Decobecq S., Le Déan L., Lukomska E., Picquet M. L., Kaas R. et Muller-Feuga, 2000. Ecophysiologie et culture en continu de *Isochrysis galbana affinis Tahiti*. R. Int. DRV/VP/PBA 2000/003, pp 28.

Decobecq S., 1999. Optimisation des conditions de culture de la micro-algue T.ISO. Rapport de stage - UTC (Université Technologique de Compiègne).

Fabregas J., Herrero C., Abalde J. and Cabezas B., 1985. Growth, chlorophyll a and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 50 : 1-11.

Fabregas J., Herrero C., Cabezas B. and Abalde J., 1986. Biomass production and biochemical composition in mass culture of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke at varying nutrient concentrations. *Aquaculture*, 53 : 101-113.

Fabregas J., Toribio L., Abalde J., Cabezas B. and Herrero C., 1987. Approach to biomass production of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch using common garden fertilizer and soil extract as cheap nutrient supply in batch culture. *Aquaculture*, 36 : 245-256.

Glize P., 1994. Essais de culture de T.ISO sur l'eau souterraine salée du polder de Bouin. Rapport Syndicat mixte pour le développement aquacole en Pays de Loire. pp 24.

Herzig R. and Falkowski P.G., 1989. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). Photosynthetic energy conversion and growth efficiencies. *J. Phycol.*, 25 : 462-471.

Kain J.M. and Fogg G.E., 1960. Studies on the growth of marine phytoplankton. *Prorocentrum micans* Ehrenberg. *J. mar. Biol.*, 39 : 33-55.

Le Déan L. and Gautier F. 1991. Détection automatique par visionique des *Dinophysis* spp contenus dans des échantillons d'eau de mer. Rapport interne IFREMER –DRO-91.03.MR.

Miner P., 1998. Production de microalgues fourrage en culture continue. Proposition pour 1999. Rapport interne. IFREMER.

Morel F.M.M., Hudson R. and Price N., 1991. Limitation of productivity by trace metals in the sea. *Limnol. Oceanogr.*, 36(8) : 1742-1755.

Provasoli L., 1958. Growth factors in unicellular marine algae. *Ann. Rev. Microbiol.*, 12 : 279-308.

Raven J.A., 1988. The iron and molybdenum use efficiencies of plant-growth with different energy, carbon and nitrogen-sources. *New Phytol.*, 109 : 279-87.

Richmond A., 1986. Handbook of microalgal mass culture. CRC Press.

Sathi M.A. and Gopinathan C.P., 1993. Effect of nutrients on the photosynthetic rate of some phytoflagellates. *CMFRI Spec. Publ.*, 55 : 107-114.

Sunda W.G., 1989. Trace metal interactions with marine phytoplankton. *Biol. Oceanogr.*, 6 : 411-442.

Valenzuela-Espinoza E., Millan-Nunez R and Nunez-Cabrero F., 1999. Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis* aff. *Galbana* (clone T-iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquaculture engineering*, 20 : 135-147.

Walne P.R., 1966. Experiments in the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. L.
Fish. Invest. Minist. Agric. Fish. Food., 2, 25 (4).