

- (1) Laboratoire Physiologie des Invertébrés Marins
Station expérimentale d'Argenton
Presqu'île du Vivier
29840 Argenton en Landunvez
Tel 02 98 89 51 05 – Fax 02 98 89 57 77
- (2) Laboratoire Production et Biotechnologie des Algues
Rue de l'île d'Yeu BP 21105
44311 Nantes cedex 3
Tél 02 40 37 41 24 - Fax 02 40 37 40 73



(4) JOUIN PLASTIQUES INDUSTRIELS
ZA La Verdière - 44470 Mauves-sur-Loire



(3) Université de Nantes
Laboratoire GEPEA
Faculté des Sciences et des Techniques
2 rue de la Houssinière BP 92208
44322 NANTES Cedex 3
Tel : 02 51 12 55 09

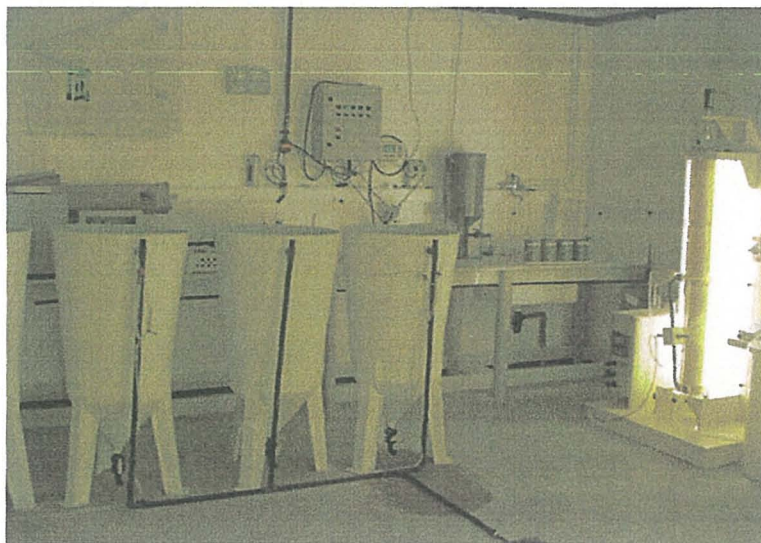


(5) Polder des Champs
85230 BOUIN

Angeri S.⁽⁵⁾, Bougaran G.⁽²⁾, Connan J. P.⁽¹⁾, Jouin J.C.⁽⁴⁾, Kaas R.⁽²⁾, Le Déan L.⁽²⁾, Legrand J.⁽³⁾, Loubière K.⁽³⁾,
Lukomska E.⁽²⁾, Olivo E.⁽²⁾, Picquet M. L.⁽²⁾, Pruvost J.⁽³⁾, Robert R.⁽¹⁾

Optimisation de la production en écloserie de mollusques :

Mise au point d'un pilote industriel de production
phytoplanctonique en continu et des techniques associées pour
leur intégration en écloserie commerciale



SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	1
2. ETUDE DE LA CULTURE EN CONTINU DE <i>CHAETOCEROS SP.</i>	2
3. PERFORMANCES DES REGIMES CONTINUS SUR LES ELEVAGES LARVAIRES DE MOLLUSQUES	4
3.1. ISOCHRYSIDALE	4
3.1.1. <i>Matériels et méthodes</i>	4
3.1.2. <i>Résultats</i>	5
3.2. DIATOMOPHYCEES	10
3.2.1. <i>Matériels et méthodes</i>	10
3.2.2. <i>Résultats</i>	11
4. DEVELOPPEMENT DU PHOTOBIOREACTEUR D'ECLOSERIE COMMERCIALE ET DES PERIPHERIQUES ASSOCIES	22
4.1. DEVELOPPEMENT DU PILOTE.....	22
4.1.1. <i>Etudes expérimentales</i>	22
4.1.2. <i>Spécifications du pilote</i>	29
4.2. DEVELOPPEMENT DES PERIPHERIQUES	30
4.2.1. <i>Reconstitution du milieu de culture en ligne</i>	30
4.2.2. <i>Automatisation de la distribution des microalgues</i>	32
5. CONCLUSION	34

1. Introduction

Malgré de nombreux travaux sur les éléments de substitution, les microalgues vivantes demeurent à ce jour la seule source d'alimentation pour les mollusques bivalves en éclosérie. Avec les pratiques actuelles, on considère qu'environ 30% du coût de revient du naissain d'éclosérie est imputable à la production phytoplanctonique (Valenzuela Espinoza, Millan Nunez et al. 1999). Si les écloséries de mollusques ont longtemps été confinées à un rôle mineur avec 5 à 10 % de part de marché, elles occupent actuellement en France plus de 15 à 20% du négoce des juvéniles, et on considère qu'elles pourraient atteindre, en l'état, 25 à 35% dans un proche avenir, conduisant alors à un accroissement sensible de leur consommation de microalgues. La dépendance croissante de la filière ostréicole vis à vis des écloséries nécessite une amélioration des productions phytoplanctoniques, afin d'éviter l'introduction de pathogènes, d'optimiser la survie et la croissance des larves, pour préserver et asseoir la compétitivité économique des entreprises françaises du secteur.

Plusieurs aspects doivent être envisagés pour répondre à cet objectif : une meilleure connaissance de la taxonomie des microalgues cultivées (1) et de leur écophysiole (2), et l'amélioration des techniques de production (3). L'aspect (1) a fait l'objet de travaux antérieurs (Robert, Chrétiennot-Dinet et al. 2004) et a permis de caractériser finement les microalgues fourrage les plus usitées en éclosérie et celles qui seront utilisées dans la présente étude. Ces premiers travaux ont permis de dégager les bases et techniques nécessaires à une bonne caractérisation de ces petits organismes marins (2-12 μ m). Les points (2) et (3) ont été engagés sur la période 2004–2005, dans le cadre de précédents contrats ayant reçu le soutien de la région. Ces contrats ont permis les développements technologiques nécessaires à la mise en place des études sur l'écophysiole des microalgues. Des avancées sensibles ont également été obtenues sur les techniques de production phytoplanctoniques en écloséries, à travers des études sur le transfert de la culture en continu à l'échelle expérimentale et sur le développement d'un photobioréacteur spécifiquement adapté aux écloséries commerciales. L'ensemble de ces travaux est poursuivi dans le cadre d'un Groupement De Recherche « microalgues fourrage » piloté et financé par Ifremer et visant à asseoir ces connaissances.

Les travaux présentés dans le cadre de ce rapport d'activité rendent compte des avancées réalisées sur le plan (1) biologique, avec d'une part une étude sur le comportement du genre *Chaetoceros* en culture continue et, d'autre part, les résultats d'expérimentations sur les performances d'élevages larvaires réalisés sur la base de cultures de microalgues en continu, et (2) technologique, avec la continuité des actions de développement du photobioréacteur destiné aux écloséries commerciales ainsi que des périphériques indispensables à son intégration dans le secteur aquacole.

2. Etude de la culture en continu de *Chaetoceros* sp.

Si la culture en continu de *Isochrysis galbana affinis* Tahiti ne pose désormais plus de difficultés particulières, celle du genre *Chaetoceros* n'est pas encore maîtrisée. Des essais antérieurs, sur de petites espèces de ce genre avaient permis d'observer que l'équilibre de la culture en chemostat est difficile à maintenir et présente un comportement oscillatoire (Figure 1). L'objectif de cette étude est donc d'identifier la ou les causes de ce comportement, en se basant sur *Chaetoceros gracilis*, qui est une espèce très largement utilisée dans les écloseries françaises pour l'élevage des stades larvaires de *Crassostrea gigas*.

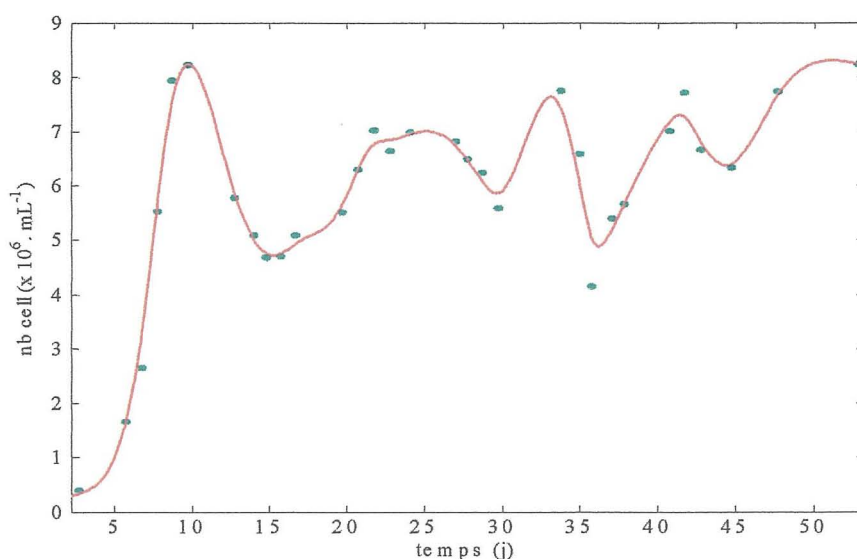


Figure 1 culture en chemostat de *Chaetoceros* sp., présentant un comportement oscillatoire.

Comparativement aux Prymnesiophycées, les *Chaetoceros* présentent un cycle de vie complexe, mettant en œuvre divers types cellulaires. Comme le montre la Figure 2, les cellules végétatives de *Chaetoceros* ont tendance à diminuer en taille au fur et à mesure des divisions successives. A partir d'une taille minimale, la reproduction entre en jeu, par l'intermédiaire de gamètes mâles mobiles et de gamètes femelles immobiles. Cette reproduction sexuée donne naissance à une nouvelle cellule de taille supérieure. Sans être obligatoire, il peut y avoir formation d'auxospores, dont le frustule néoformé aura toutes les caractéristiques du taxon. Le déclenchement de la reproduction sexuée serait soumis, pour certains auteurs, à un stimulus de réduction de taille du frustule (Drebes, 1977), pour d'autres, à une horloge biologique interne non dépendante des conditions environnementales (Lewis, 1984).

Quand les conditions de milieu deviennent défavorables (baisse de la température, de l'éclairement ou de la teneur en sels nutritifs), les diatomées peuvent former deux types cellulaires de repos : les cellules de repos et les spores de repos. Les spores de repos sont des cellules à paroi fortement silicifiée, elles se différencient souvent à l'intérieur des valves de la cellule végétative (spores endogènes) et sont généralement morphologiquement très différentes de la cellule végétative dont elles sont issues (Ricard, 1987). Les cellules de repos sont généralement morphologiquement identiques aux cellules végétatives.

Ces formes de repos sédimentent généralement sur le fond où elles entrent dans un processus de dormance et attendent les conditions favorables à un nouveau développement. Lorsque ces conditions réapparaissent, elles germent pour redonner un organisme à morphologie classique.

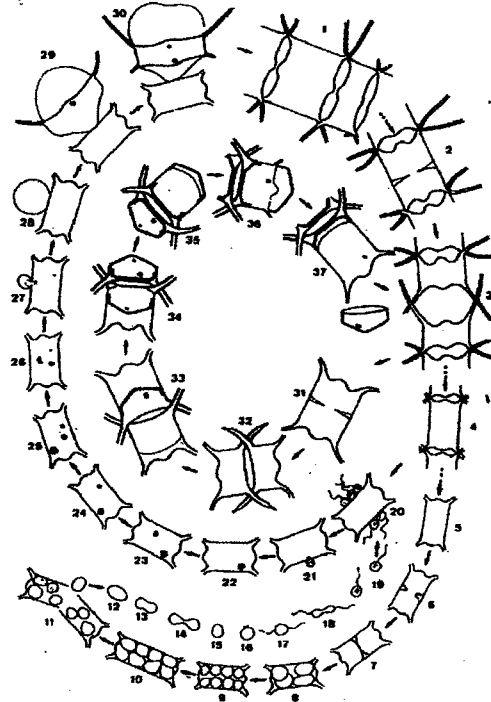


Figure 2 Etapes du cycle de vie de *C. didymum* : 1 à 4 Divisions végétatives ; 6 à 30 Cycle sexuel ; 27 à 30 Formation de l'auxospore ; 31 à 37 Cycle des spores de résistance. (Von Stosch, 1973)

Plusieurs facteurs déclencheurs de la formation des spores de repos ont été décrits dans la littérature. Une limitation par un nutriment tel que l'azote (Oku and Kamatani, 1997) et le phosphore (Oku and Kamatani, 1995), une irradiance trop faible ou trop forte, une densité de population élevée, une taille minimale des cellules ... peuvent conduire à quitter la phase végétative. Dans le cas de cultures en continu, la diminution de taille des cellules ne peut être responsable des phénomènes oscillatoires observés, en raison de leur fréquence d'apparition, de l'ordre de la semaine ; comparativement, la réduction de taille ne peut entraîner la reproduction sexuée qu'après un millier de générations cellulaires environ.

Les travaux, menés dans le cadre de ce contrat, se sont focalisés sur l'influence des limitations par la lumière et un nutriment sur le comportement des cultures en chemostat de *Chaetoceros gracilis*. Pour chaque type de limitation, deux cultures successives ont été réalisées, dont les conditions en chemostat sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1 conditions de culture de *Chaetoceros gracilis* en N-limitant et irradiance-limitante

	N-limitant	Irradiance -limitante
Apport de N (mMole.L ⁻¹)	0.12	3.36
Irradiance (μmol.m ⁻² .s ⁻¹)	130 (10)	43 (10)
pH	8 (0.1)	8 (0.1)
Température (°C)	19 (1)	19 (1)
Taux de dilution (j ⁻¹)	0.5	0.5
Inoculum (cell.mL ⁻¹)	5.10 ⁵	5.10 ⁵
Salinité (‰)	33	33

Les chémostats limités en azote montrent l'incapacité des cellules à stabiliser leur taux de croissance à la valeur du taux de dilution imposé (Figure 3). De fortes variations de concentrations cellulaires sont enregistrées au cours de la culture, entre 1 et 2.5 10⁶ cell.mL⁻¹.

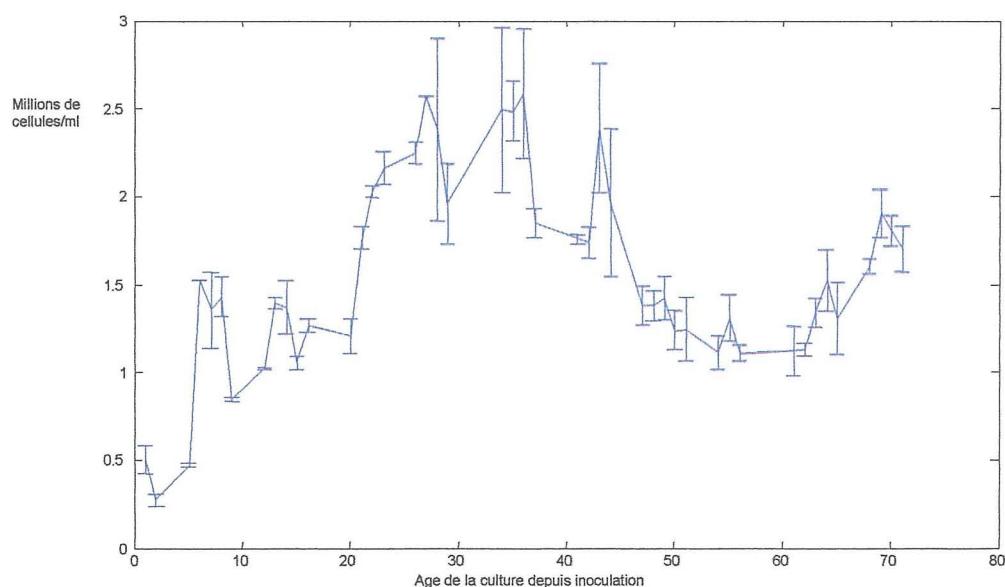


Figure 3 concentration cellulaire en fonction du temps dans un chémostat de *C. gracilis* en condition N-limitant.

A contrario, les chémostats en irradiance limitante (Figure 4) parviennent à établir, au bout de 8 jours, une situation d'équilibre où la concentration cellulaire demeure généralement comprise entre 3.3 et 4 10⁶ cell.mL⁻¹, avec une valeur moyenne de 3.9 10⁶ cell.mL⁻¹. Il est

important de souligner que la variabilité relative de l'équilibre, obtenu dans ces conditions, est du même ordre que celle obtenue en général sur les cultures de T-iso, qui sont considérées comme une référence en la matière. Des analyses statistiques de comparaison de moyennes, basées sur le Test de Kolmogorov-Smirnov au niveau de confiance de 95%, montrent que les cultures répétées dans les mêmes conditions de limitation possèdent un comportement comparable.

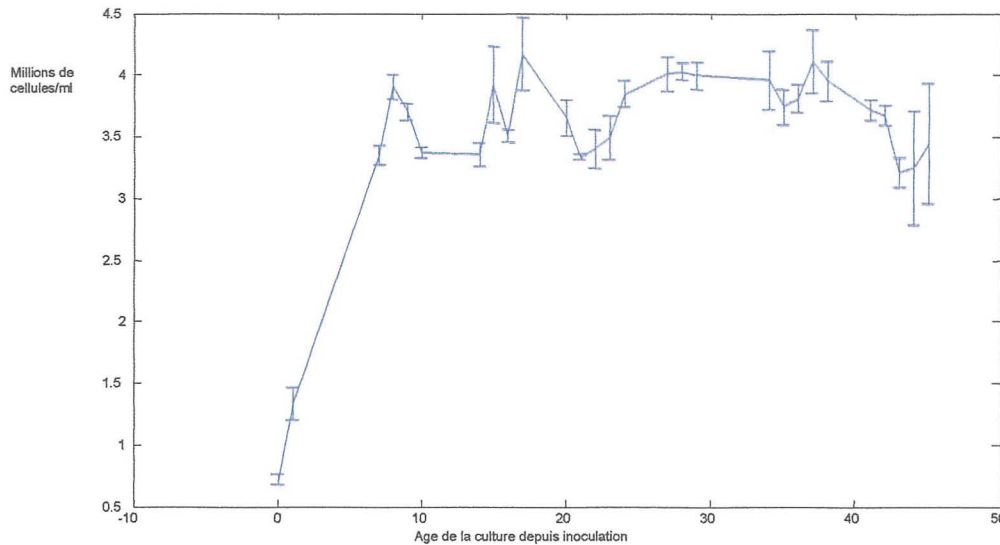


Figure 4 concentration cellulaire en fonction du temps dans un chémostat de *C. gracilis* en condition irradiance-limitante.

Les observations microscopiques des cellules produites dans les deux types de conditions montrent des différences nettes de morphologie. Dans le cas des cellules limitées par l'azote, le cytoplasme est polarisé et présente une granulation importante. De même, il y a visiblement une perte de pigments accessoires, qui laisse penser à des cellules en dégénérescence (Figure 5). A l'inverse, en condition d'irradiance limitante, les cellules sont caractérisées par un cytoplasme uniformément réparti et une pigmentation normale (Figure 6). Il est à noter que les cellules ou les spores de résistance, ni même les auxospores n'ont été observées dans les différentes cultures en chémostat. En ce qui concerne ces dernières, elles n'ont été observées qu'en phase plateau avancée dans des cultures en batch (Figure 7). Des analyses de concentrations d'oxygène ont également été conduites et ont permis de vérifier que les cultures limitées par l'azote ne connaissent pas de toxicité directe par l'oxygène. On ne peut cependant pas écarter la possibilité d'interactions entre le statut nutritif de l'algue, l'irradiance disponible et sa sensibilité à l'oxygène.

Quelle que soit la cause réelle, il apparaît clairement que les conditions de limitation par l'irradiance sont favorables au maintien des cultures en chémostat de *C. gracilis*. Ces mêmes conditions ont été mises en application dans les photobioréacteurs expérimentaux de 17-L installés à la station d'Argenton et ont permis d'entretenir l'équilibre des cultures sur des volumes conséquents.

Cette première étude de l'impact des conditions du milieu sur le comportement des microalgues du genre *Chaetoceros* en culture continue a conduit à définir des conditions permettant d'envisager la production continue de ces algues. Cette étude ne constitue qu'une

première étape ; il sera nécessaire de mieux comprendre, au niveau physiologique, les mécanismes responsables de l'instabilité des cultures.

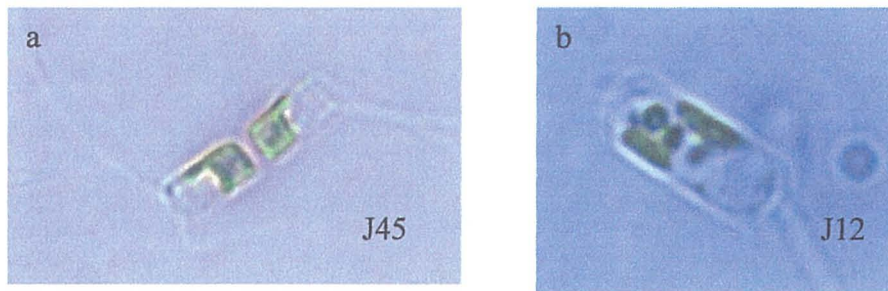


Figure 5 photographies microscopiques des cellules de *C. gracilis* en chemostat sous N limitant, aux jours 12 et 45. Grossissement x 100.

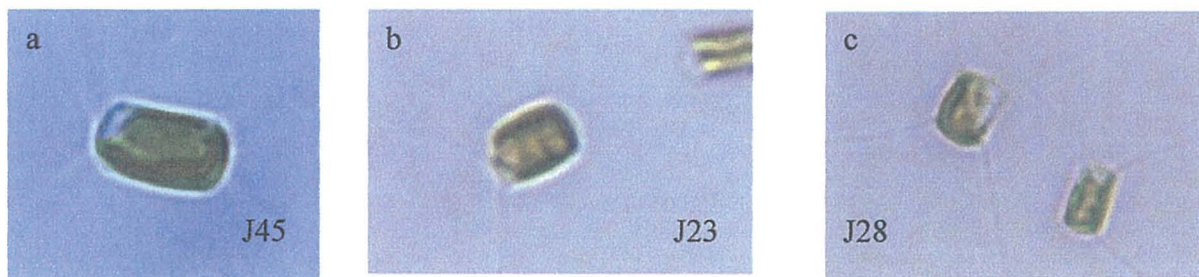


Figure 6 photographies microscopiques des cellules de *C. gracilis* en chemostat sous irradiance limitante, aux jours 23, 28 et 45. Grossissement x 100.

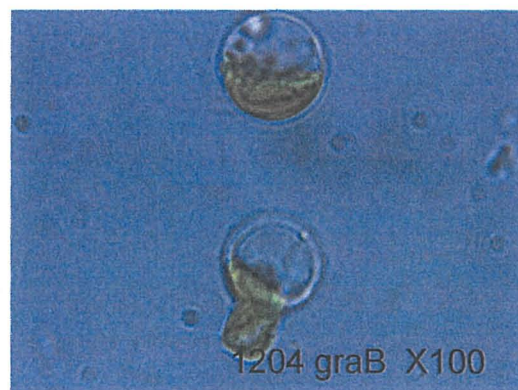


Figure 7 photographie microscopique d'auxospores de *C. gracilis*. Grossissement x 100.

3. Performances des régimes continus sur les élevages larvaires de mollusques

Les études des performances d'élevages larvaires de *Crassostrea gigas* menées en 2006 ont concerné des élevages nourris sur la base de régimes monospécifiques, ainsi que de régimes bi-spécifiques (association de t-Iso et *Chaetoceros gracilis*). Cinq séries d'expériences ont été conduites au cours de cette période. L'objectif était de comparer les performances d'élevages obtenues en croisant les conditions d'élevage en flux ouvert ou en séquentiel (référence) avec le mode de production des microalgues, en batch (référence) ou en continu.

3.1. Isochrysidale

3.1.1. Matériels et méthodes

Les larves étaient élevées à la densité de 5 individus.ml⁻¹ à la température de 25°C selon deux techniques d'élevage, le séquentiel avec changement d'eau tous les deux jours ou en flux ouvert où eau et nourriture étaient apportées en continu afin de maintenir en permanence un environnement nutritionnel de **30-40 cellules** autour de chaque larve. Pour le séquentiel la nourriture était apportée une fois par jour à raison de **50 cellules/μl d'eau d'élevage la première semaine et 100 cellules ultérieurement**. Le phytoplancton était cultivé selon deux techniques, le batch en ballon de 6l ou cylindre de 300l selon des méthodes classiques à Argenton et largement éprouvées (Ponis et al., 2006) ou en continu en photobioréacteurs de 17L (Bougaran et al., 2003). Les élevages étaient conduits en duplicata en bacs cylindro-conique de 30L et 150L, ce dernier autorisant un suivi biochimique. Ces bacs étaient nettoyés à chaque vidange, c'est à dire tous les deux jours en séquentiel, et seulement une fois par semaine en flux ouvert. Afin d'autoriser le brassage dans la colonne d'eau un débit d'air était maintenu à 0.1L.min⁻¹ et aucun antibiotique n'était apporté. Des prélèvements de larves étaient régulièrement opérés : tous les deux jours pour l'acquisition de la longueur en analyse d'images, de la mortalité par dénombrement des larves translucides au projecteur de profil et de leur qualité à travers leur réserve lipidique total au moyen d'un index colorimétrique ou une fois par semaine pour leur état physiologique à travers la détermination du ratio triglycérides/stérols. Plusieurs séries expérimentales ont été conduites. Elles concernaient toutes l'influence combinée de la technique de culture phytoplanctonique (batch vs continu) de différentes microalgues et de la technique d'élevage larvaire (séquentiel vs flux ouvert) sur le développement larvaire de *Crassostrea gigas*.

Deux expérimentations ont été menées sur t- Iso. **La première concernait une ponte du 05 avril 2006 et portait sur l'influence d'*Isochrysis aff. galbana*** produit en batch en cylindre ou en continu en photobioréacteur de 17L sur des larves de *Crassostrea gigas* élevées en séquentiel ou en flux ouvert. En ce qui concerne la production en continu et afin d'obtenir deux types potentiels de nourriture (culture jeune et culture âgée) deux taux de renouvellement étaient appliqués : un renouvellement total journalier (100%) et un renouvellement partiel (20%) des cultures. Un témoin négatif était maintenu à jeun tandis que le témoin positif conduit en séquentiel recevait la ration de référence, TCp (*Isochrysis aff. galbana* et *Chaetoceros calcitrans forma pumilum*) produit en batch. Une panne a entraîné l'arrêt des productions phytoplanctonique en photobioréacteurs et cette première expérimentation n'a donc pu être conduite au delà du 16^e jour d'élevage larvaire. Une

deuxième expérimentation a donc été réalisée. Elle concernait une ponte du 12 mai 2006 et comportait le même dispositif expérimental.

3.1.2. Résultats

3.1.2.1. Gig. 0605

Seul le témoin négatif (larves maintenues à jeun) n'a pu être conduit à terme, l'élevage étant entièrement décimé au 14^e j (tableau 1). L'élevage témoin présentait une faible survie puisqu'au 16^e j seules 30% des larves étaient vivantes. Ces faibles survies, du même ordre de grandeur (25-32%) étaient également relevées pour toutes les autres conditions d'élevage en séquentiel quelle que soit la façon dont le phytoplancton était produit (batch ou continu : tableau 1). Par contre, cette situation est très largement améliorée lorsque les larves sont élevées en flux ouvert avec des survies comprises entre 55 et 65% (Tableau 2). Pour des raisons techniques les élevages n'ont pas été poursuivis au delà et de ce fait aucune donnée de compétence n'a été acquise.

Tableau 2 : Durée de l'élevage larvaire et survie, chez *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *Isochrysis aff. galbana* produit en batch (PB) ou en continu (PC) à deux taux de renouvellement de la culture, 20% (PC20) et 100% (PC100).

Gig. 0605		Fin de l'élevage larvaire (j)	Survie J7 (%)	Survie J14 (%)	Survie J16 (%)
Témoin					
(TCp)	16	93,5 (1,6)	31,6 (8,0)	28,7 (2,2)	
A jeun	16	80,9 (2,6)	0	---	
ESPC20	16	89,5 (1,9)	39,2 (4,0)	32,0 (6,8)	
ESPC100	16	85,4 (2,5)	27,0 (10,5)	24,8 (1,7)	
ESPB	16	86,2 (4,8)	32,6 (12,6)	27,6 (4,8)	
FOPC20	16	71,0 (4,4)	63,1 (8,9)	46,3 (8,6)	
FOPC100	16	70,7 (4,1)	61,4 (13,6)	59,1 (12,5)	
FOPB	16	64,9 (5,7)	55,4 (7,3)	55,3 (15,7)	

Avec $0,5 \mu\text{m j}^{-1}$, l'élevage maintenu à jeun ne présente aucune croissance, alors que les témoins positifs atteignent $16 \mu\text{m j}^{-1}$ (Fig. 1). Les larves élevées en flux ouvert présentent une croissance inférieure celle-ci étant cependant très satisfaisante pour une alimentation de type monospécifique puisque ces taux sont compris entre $10,5$ et $12 \mu\text{m j}^{-1}$.

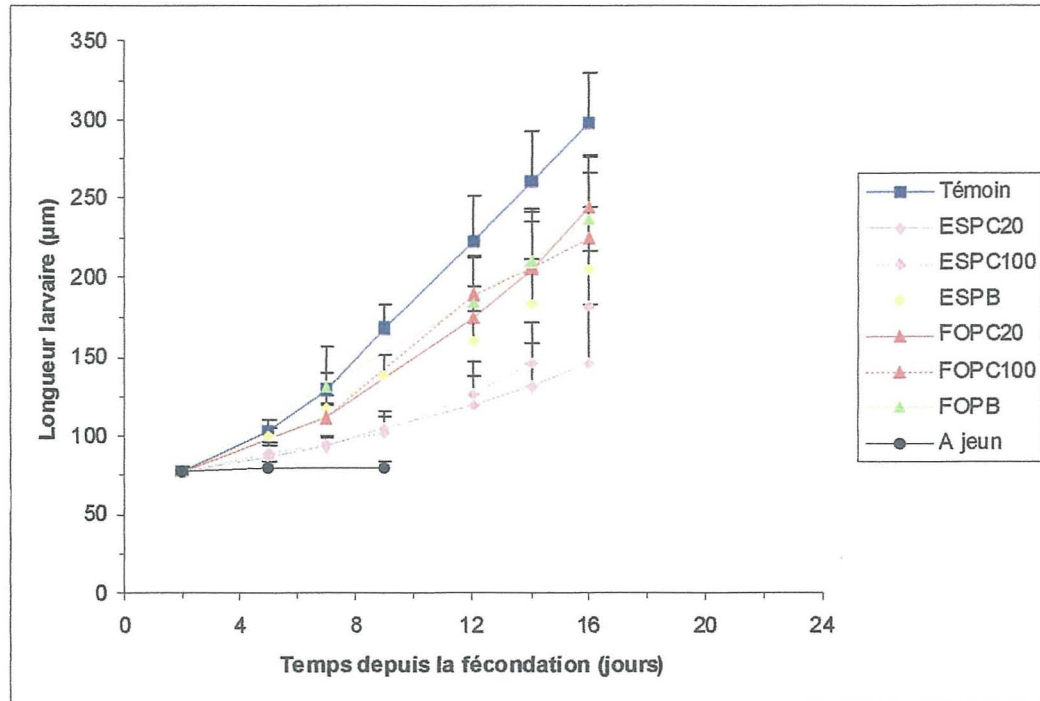


Figure 8: Croissance larvaire de *C. gigas* élevée en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *Isochrysis aff. galbana* produite en batch (PB) ou en continu (PC) à deux taux de renouvellement de la culture, 20% (PC20) et 100% (PC100). Le témoin positif correspond à un élevage conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch) tandis que le témoin négatif n'est pas alimenté. (A jeun).

Tableau 3 : Caractéristiques biochimiques des larves de *C. gigas* en fin d'élevage (16^e jour) conduites en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentées avec *Isochrysis aff. galbana* produit en batch (PB) ou en continu (PC) à deux taux de renouvellement de la culture, 20% (PC20) et 100% (PC100). Le témoin positif correspond à un élevage conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch).

	Poids sec (ng larve ⁻¹)	Poids matière organique (ng larve ⁻¹)	100*MO/PS	Teneur en TAG (pg larve ⁻¹)	Teneur en stérols (pg larve ⁻¹)	TAG/ST
Témoin						
(TCp)	4708 (921)	1487 (237)	31,6 (8,0)	144,0 (40,3)	14,4 (3,7)	14,7 (1,2)
ESPC20	1030 (4)	291 (37)	39,2 (4,0)	8,5 (1,2)	2,0 (0,6)	3,7 (0,3)
ESPC100	1014 (103)	291 (8)	27,0 (10,5)	0,0	0,8 (0,0)	0,0
ESPB	1295 (66)	480 (2)	32,6 (12,6)	21,0 (1,7)	2,2 (0,4)	9,9 (1,9)
FOPC20	2721 (179)	930 (106)	63,1 (8,9)	48,3 (12,0)	5,3 (0,2)	10,2 (1,2)
FOPC100	2224 (79)	801 (47)	61,4 (13,6)	38,1 (3,0)	6,6 (0,8)	6,1 (0,7)
FOPB	4034 (341)	1392 (115)	55,4 (7,3)	120,8 (39,0)	8,1 (1,5)	16,5 (3,3)

Par contre, les autres élevages recevant également une alimentation monospécifique mais conduits en séquentiel présentent un faible développement et les plus mauvaises performances concernent les larves nourries de phytoplancton produit en continu (5-7,5µmj⁻¹ : Figure 8). Les plus fortes croissances pondérales sont enregistrées chez le témoin et la condition FOPB avec des poids secs d'environ 5000 et 4000 mg larve⁻¹ au 16^e jour et les plus faibles par des petits poids sec totaux (≈1000 mg larve⁻¹) et organique (≈300 mg larve⁻¹ : Tableau 3). Par contre, l'indice de condition en fin d'élevage (16^e jour) ne reflète pas ses écarts de performances puisque le témoin présente une valeur d'indice de condition peu différente des autres élevages en batch (30-40 : Tableau 3). A l'inverse, le rapport TAG/ST à J16 traduit assez fidèlement les performances zootechniques avec une forte valeur (15-16) rattachée à un bon développement et inversement (Tableau 3).

L'étude de l'évolution des réserves lipidiques par colorimétrie et analyse d'images montre que chez le témoin la surface occupée par les triglycérides est élevée (≈ 26-28 %) et relativement stable au cours du temps à partir du 7^e jour, aucune mesure n'ayant été opérée en début d'élevage (Figure 9). Les élevages séquentiels alimentés à partir de phytoplancton produit en continu et, quel que soit son taux de renouvellement, montrent une faible surface d'occupation lipidique, de l'ordre de 5% (Figure 9). Par contre, les élevages en flux ouvert, qui présentent, rappelons le, une bonne survie et une croissance satisfaisante, mettent en avant des valeurs d'occupation assez proche de celles de l'élevage en séquentiel à partir de phytoplancton produit en batch (ESPB) mais dont les performances de développement sont médiocres.

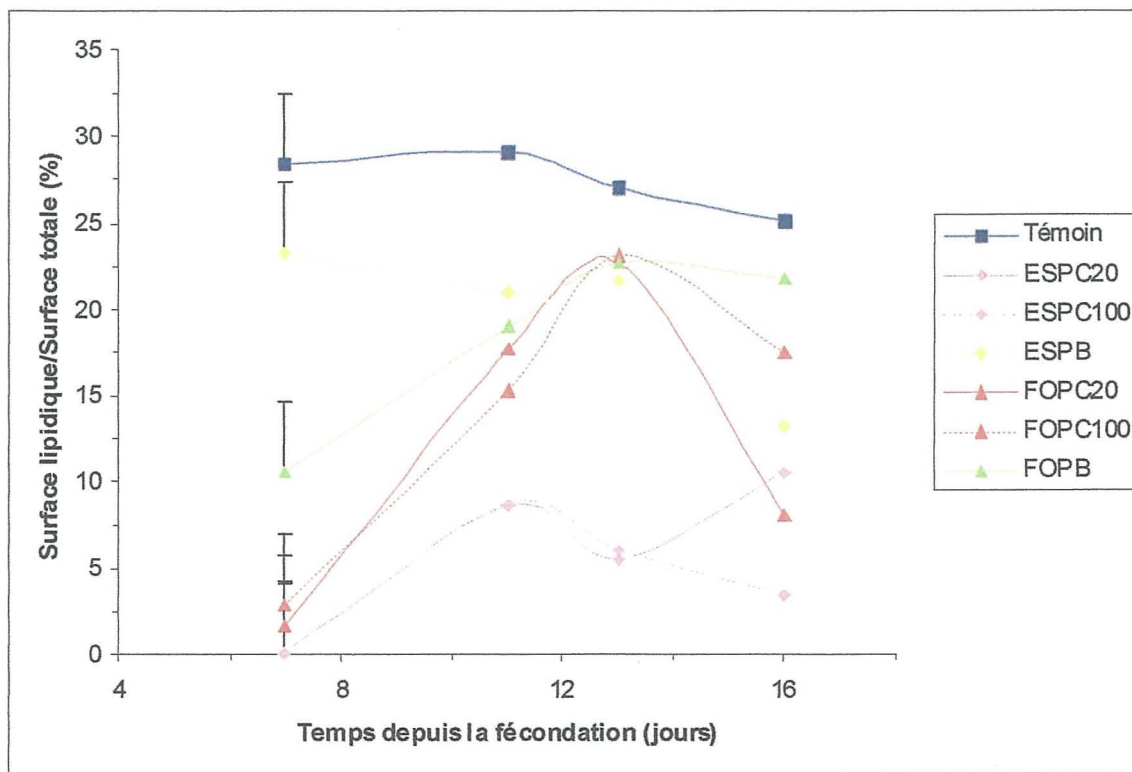


Figure 9: Evolution de l'indice lipidique chez des larves de *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentées avec *Isochrysis aff. galbana* produite en batch (PB) ou en continu (PC), à deux taux de renouvellement de la culture, 20% (PC20) et 100% (PC100). Le témoin positif correspond à un élevage conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch).

3.1.2.2. Gig. 0606

Seules les larves élevées en flux ouvert et recevant du phytoplancton produit en continu à faible taux de renouvellement (FOPC20), n'ont pu être menées à terme, les élevages étant décimés au 21^e j (Tableau 4). De faibles survies, de l'ordre de 30% étaient également relevées pour les élevages conduits en séquentiel, celles-ci étant exacerbées (17%) lorsque les larves recevaient du phytoplancton produit en continu à 20% de renouvellement (Tableau 4). La qualité intrinsèque des larves à la formation et/ou la qualité biologique de l'eau d'élevage étaient particulièrement élevées puisque les élevages à jeun ont été maintenues jusqu'au 21^e jour avec une excellente survie (91% : Tableau 4). Il faudra attendre le 25^e j pour noter une mortalité totale. Aucun apport nutritionnel extérieur n'a été relevé pour ces témoins négatifs qui montrent une quasi absence de croissance avec $0,8 \mu\text{m j}^{-1}$ (Figure 10). A l'inverse, le témoin positif recevant une alimentation plurispécifique croissaient rapidement à raison de $16,2 \mu\text{m j}^{-1}$ (Fig. 3). De ce fait, 78% des larves étaient compétentes au 16^e jour et celles-ci engendraient 64 % de postlarves (Tableau 4). Les larves élevées en séquentiel présentaient un moindre développement avec environ $11 \mu\text{m j}^{-1}$ et atteignaient une compétence légèrement inférieure à celle du témoin positif (50-65%) avec 5 jours d'élevage supplémentaires (21^e j) mais expriment des taux similaires de métamorphose (55-60% : Tableau 4). Par contre, alors que leur croissance étaient identique jusqu'au 14^e jour un événement est apparu sur les élevages en flux ouvert qui a entraîné un ralentissement marqué de la croissance (Figure 10). De ce fait leur croissance globale est médiocre et ne représente que la moitié de celle du témoin positif (de l'ordre de $8 \mu\text{m j}^{-1}$). Peu de larves compétentes étaient alors enregistrées (20-25%) et il en était de même pour les taux de métamorphose compris entre 15 et 35 % (Tableau 4)

Tableau 4 : Durée de l'élevage larvaire, survie, compétence et métamorphose chez *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *Isochrysis aff. galbana* produit en batch (PB) ou en continu (PC) à deux taux de renouvellement de la culture, 20% (PC20) et 100% (PC100).

Gig. 0606	Fin de l'élevage larvaire (j)	de Survie J7 (%)	Survie (%)	J14Survie ou 21(%)	J16fin d'élevage larvaire (%)	Compétence en d'élevageTaux de métamorphose (%)
Témoin						
(TCp)	16	98,6 (1,3)	67,1 (8,9)	61,1 (5,8)	78,4 (8,4)	64,1 (14,2)
A jeun	21	100	96,3 (0,7)	90,7 (2,8)	---	---
ESPC20	21	96,6 (1,5)	33,9 (14,1)	16,7 (7,4)	63,6 (5,6)	57,8 (6,7)
ESPC100	21	97,7 (0,5)	48,3 (19,5)	31,8 (20,4)	51,0 (32,0)	58,0 (7,6)
ESPB	21	96,8 (1,4)	34,8 (6,2)	33,6 (4,5)	56,8 (2,1)	55,2 (10,7)
FOPC20	21	98,1 (0,5)	83,78 (4,2)	0	---	---
FOPC100	21	94,0 (1,7)	86,2 (5,3)	71,1 (5,6)	24,8 (6,1)	13,3 (10,7)
FOPB	21	98,0 (1,6)	81,5 (5,2)	79,1 (6,1)	20,3 (3,7)	34,2 (8,8)

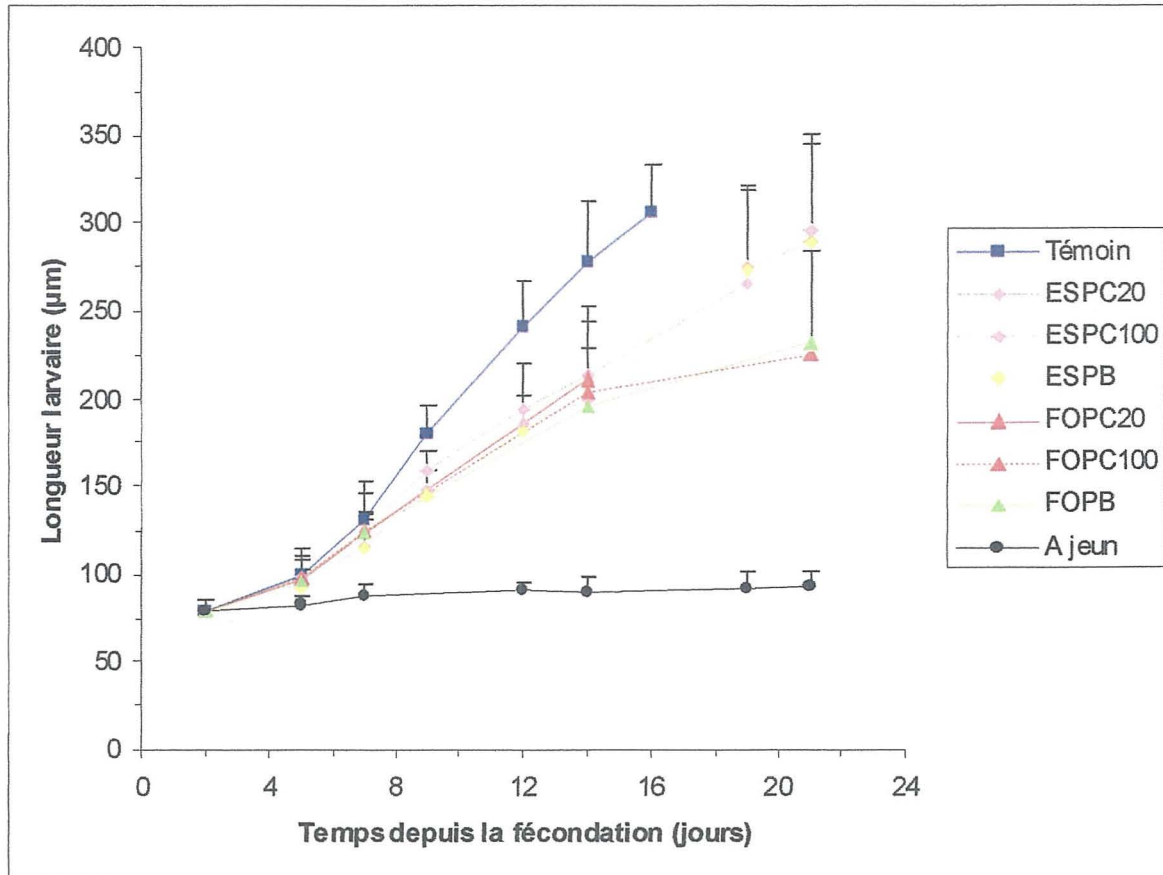


Figure 10: Croissance larvaire de *C. gigas* élevée en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *Isochrysis aff. galbana* produite en batch (PB) ou en continu (PC) à deux taux de renouvellement de la culture, 20% (PC20) et 100% (PC100). Le témoin positif correspond à un élevage conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch) tandis que le témoin négatif n'est pas alimenté. (A jeun).

A l'issue de l'embryogenèse les lipides de réserve étaient peu présents dans les larves D avec seulement 5% de surface occupée (Figure 11). Une accumulation plus ou moins marquée était enregistrée jusqu'au 13^e j en fonction des conditions expérimentales. Particulièrement prononcée chez les témoins les lipides occupaient environ 25 % de la surface larvaire. A l'approche de la métamorphose on notait un début de consommation des lipides se traduisant par une moindre surface d'occupation aux 16 et 19^e jours (17%: Figure 11). A l'inverse, les larves élevées en séquentiel et recevant du phytoplancton produit en continu présentaient une moindre accumulation de lipides, la surface d'occupation n'excédant pas 15%. Pour les autres conditions expérimentales accumulation et consommation de lipides étaient décelées sans logique apparente. Seules les témoins présentent des caractéristiques zootechniques qui peuvent être reliés en partie à l'évolution des surfaces lipidiques. En effet, une excellente croissance larvaire s'accompagne d'une forte accumulation de lipides mais un bon taux de métamorphose n'est pas ici systématiquement associé à une forte teneur lipidique les jours précédents ce passage de la vie larvaire à la vie pélagique (ex : 17% chez le témoin à J16 qui affiche 65% de métamorphose et 10% chez ESPC 100 à J19 avec 58% de métamorphose).

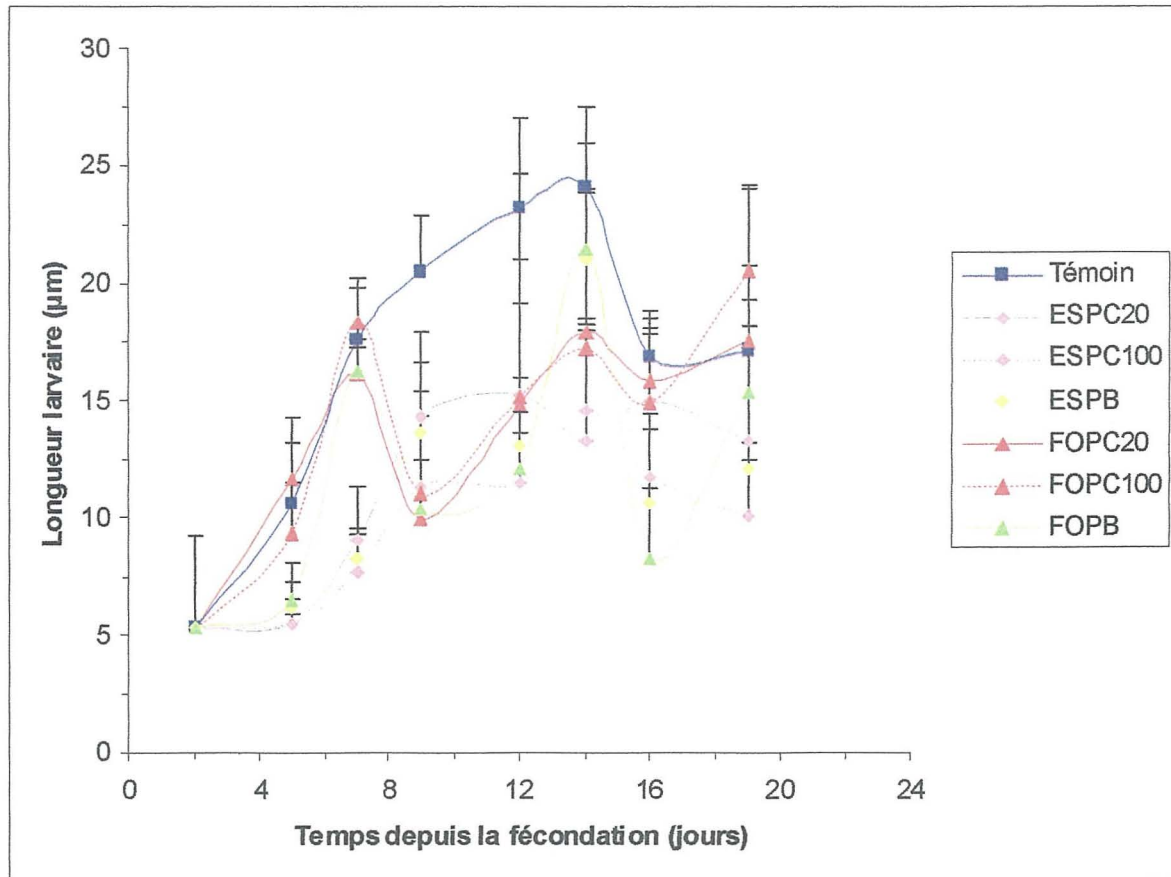


Figure 11 : Evolution de la longueur des larves de *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentées avec *Isochrysis aff. galbana* produite en batch (PB) ou en continu (PC), à deux taux de renouvellement de la culture, 20% (PC20) et 100% (PC100). Le témoin positif correspond à un élevage conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch).

3.2. Diatomophycées

3.2.1. Matériels et méthodes

Trois expériences successives ont été conduites pour étudier la nutrition des larves en flux ouvert ou en séquentiel, en croisant ces conditions avec celles des productions de microalgues, en continu ou en batch.

La première, Gig 0609, concernait une ponte réalisée en septembre 2006 et portait sur l'influence du mélange *Chaetoceros gracilis* et *Isochrysis aff. galbana* produit en batch en cylindre ou en continu en photobioréacteur de 17L sur des larves de *Crassostrea gigas* élevée en séquentiel ou en flux ouvert. Un témoin négatif était maintenu à jeun tandis que le témoin positif conduit en séquentiel recevait la ration de référence, TCp (*Isochrysis aff. galbana* et *Chaetoceros calcitrans forma pumilum* : Rico-Villa et al., 2006) produit en batch.

La deuxième, Gig 0610, concernait une ponte réalisée en octobre 2006 et portait sur l'influence de la diatomée *Chaetoceros gracilis* sur le développement larvaire de l'huître creuse. Cependant cette microalgue est a priori de trop grande taille ($80\mu\text{m}^3$) pour être facilement ingérée par des jeunes larves D. De ce fait la première semaine les larves étaient

nourries sur un régime standard TCp en 450L où *C. gracilis* était substituée par une diatomée de petite taille (*C. calcitrans* forma *pumilum*, 40 μm^3 , taille équivalente à celle de T. iso). Au delà les larves étaient réparties en 30L ou 150L et ne recevaient alors que la seule *C. gracilis*. Là encore des témoins négatif (non alimenté) et positif (recevant la ration de référence TCp tout au long de l'élevage) étaient utilisées. Un deuxième témoin positif recevant dès le début de l'élevage la seule *Chaetoceros gracilis* complétait ce dispositif expérimental :

La troisième, Gig. 0611, concernait une ponte opérée le 15 novembre 2006 et portait sur l'influence de la diatomée *Chaetoceros gracilis* sur le développement larvaire de l'huître creuse dès le stade D (2^e j). Un témoin positif conduit en séquentiel recevait tout au long de l'élevage le mélange TC (*Isochrysis aff. galbana* et *Chaetoceros gracilis*) produit en batch.

3.2.2. Résultats

3.2.2.1. Gig. 0609

Seule la condition ESPC (Elevage Séquentiel alimenté à partir de Phytoplancton produit en Continu) n'a pu être conduit à terme due à un problème dans les réacteurs à partir du 16^e j (Tableau 5). Avec une survie > 94% l'élevage témoin a été conduit avec succès. Au 18^e jour 75% de larves compétentes autorisaient au bout de 5 cinq jours 47 % de larves métamorphosées (Tableau 5). Pour les autres conditions les survies étaient moindres comprises entre 40 et 70% tandis que la compétence larvaire était généralement supérieur. Le taux de métamorphose le plus important (89%) était obtenu pour la condition ES/PB malgré un plus bas niveau de compétence au 18^e j (55%). Les autres élevages conduits en flux ouvert présentent un faible taux de métamorphose (13-16%).

Tableau 5 : Durée de l'élevage larvaire, survie, compétence et métamorphose chez *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *Isochrysis aff. galbana* et *C. gracilis* produits en batch (PB) ou en continu (PC).

	Fin de l'élevage larvaire (j)	de Survie (%)	J7Survie (%)	J14Survie (%)	J16Survie (%)	J18fin larvaire (%)	Compétence en élevage (%)	Taux de métamorphose (%)
Témoin								
(TCp)	18	95,8 (3,4)	95,7 (1,3)	95,3 (0,6)	94,1 (2,3)	75,1 (24,3)		47,4 (13,2)
ESPC	16 : éliminé	95,6 (3,9)	91,1 (3,0)	89,4 (5,8)	-----	-----		-----
ESPB	18	73,6 (23,7)	72,4 (22,9)	68,7 (32,2)	71,4 (30,3)	55,1 (22,2)		89,6 (10,4)
FOPC	16	71,8 (16,0)	62,4 (26,0)	61,6 (19,6)	ND	81,8 (8,7)		16,7 (7,6)
FOPB	18	82,7 (9,2)	64,3 (27,3)	ND	42,2 (4,4)	100		12,8 (1,8)

La plus faible croissance est observée chez les larves élevées en séquentiel et alimentées avec des microalgues produites en continu (ESPC) avec une croissance globale de 5,4 μmj^{-1} (Figure 12). Par contre, celles élevées en flux ouvert mais alimentées avec du phytoplancton produit en continu présentent une très bonne croissance avec un taux journalier de 15,6 μmj^{-1} , supérieur à celui observé chez le témoin positif (14,6 μmj^{-1} , Figure 12) mais peu différente des

autres élevages en flux ouvert alimentées avec des algues produites en batch ($15 \mu\text{m}j^{-1}$, Figure 12). La quasi absence de croissance observée chez les larves non alimentées ($0,5 \mu\text{m}j^{-1}$, Figure 12) démontre que le système de filtration de l'eau d'élevage était efficace et que les larves n'ont pas reçu, au cours de cette expérimentation d'apport nutritionnel exogène pouvant perturber l'interprétation des résultats.

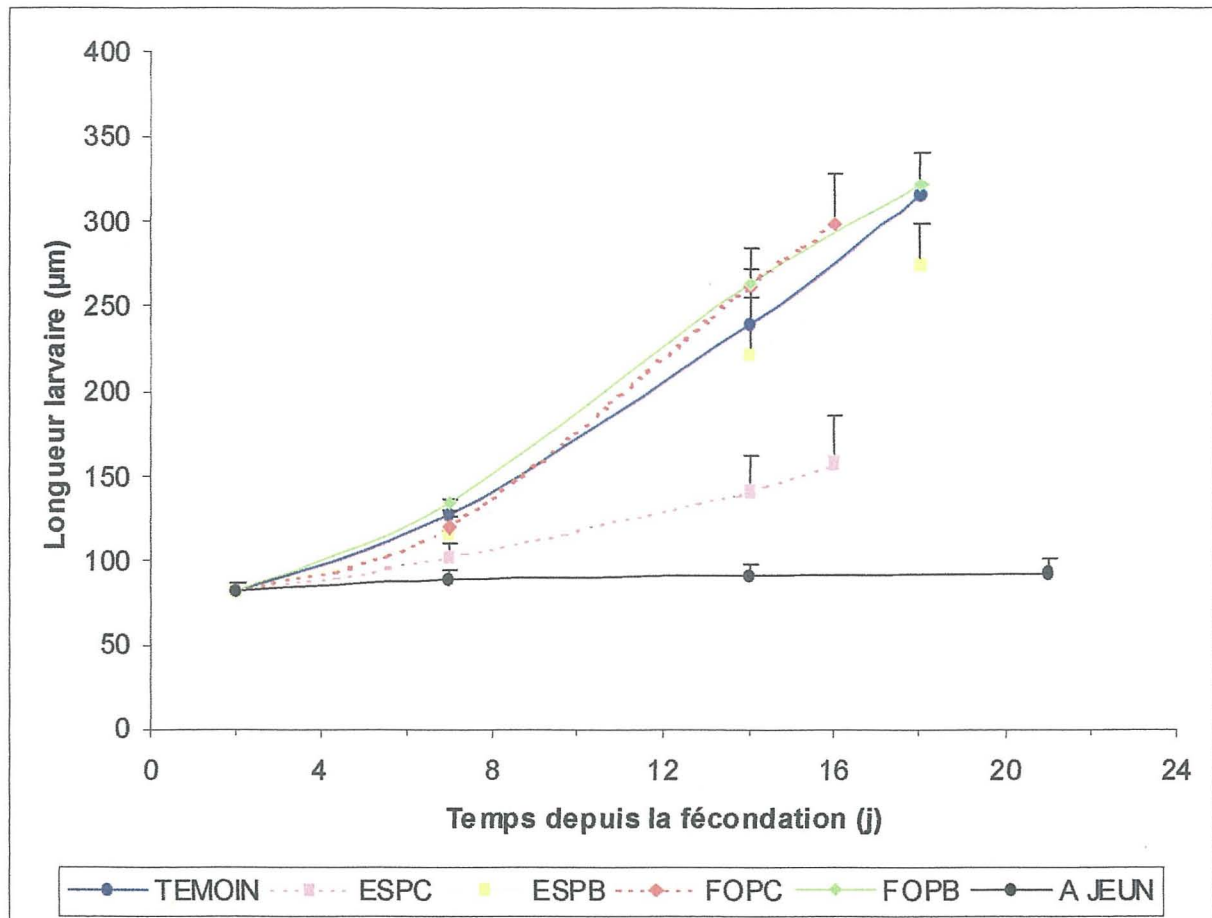


Figure 12 : Croissance larvaire de *C. gigas* élevée en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *Isochrysis aff. galbana* et *Chaetoceros gracilis* produits en batch (PB) ou en continu (PC). Le témoin positif correspond à un élevage conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch) tandis que le témoin négatif n'est pas alimenté. (A JEUN).

Au cours de cette expérimentation des résultats contradictoires sont obtenus au niveau des performances du développement puisque les meilleures croissances larvaires sont acquises chez les élevages conduits en flux ouvert (15 à $15,6 \mu\text{m}j^{-1}$) qui présentent également les taux les plus élevés de compétence larvaire mais qui se traduisent cependant par de faibles taux de métamorphose (12 à 17%).

En ce qui concerne l'indice lipidique global on note un effondrement du rapport surface lipidique /superficie de la larve pour les élevages conduits en séquentiel et alimentés avec du phytoplancton produit en continu (ESPC) avec des valeurs passant de 37% au jour 2 avec des valeurs proche de 0 jusqu'au 14^e jour. Une légère accumulation est notée ultérieurement mais celle-ci est labile puisqu'au 16^e jour cet indice n'occupe que 2% de la surface totale de la

larve (Figure 13). Les larves conduites en flux ouvert et alimentées avec du phytoplancton produit en continu présentent également un effondrement marqué de leur réserves lipidique jusqu'au 12^e jour en passant de 37% à 6-9 % mais au delà la récupération est forte (Figure 13). Pour les autres conditions une consommation des 2/3 environ des réserves lipidiques est enregistrée jusqu'aux 5^e-7^e j puis un stockage s'opère ultérieurement avec des réserves représentant 20-30% de la surface d'une larve.

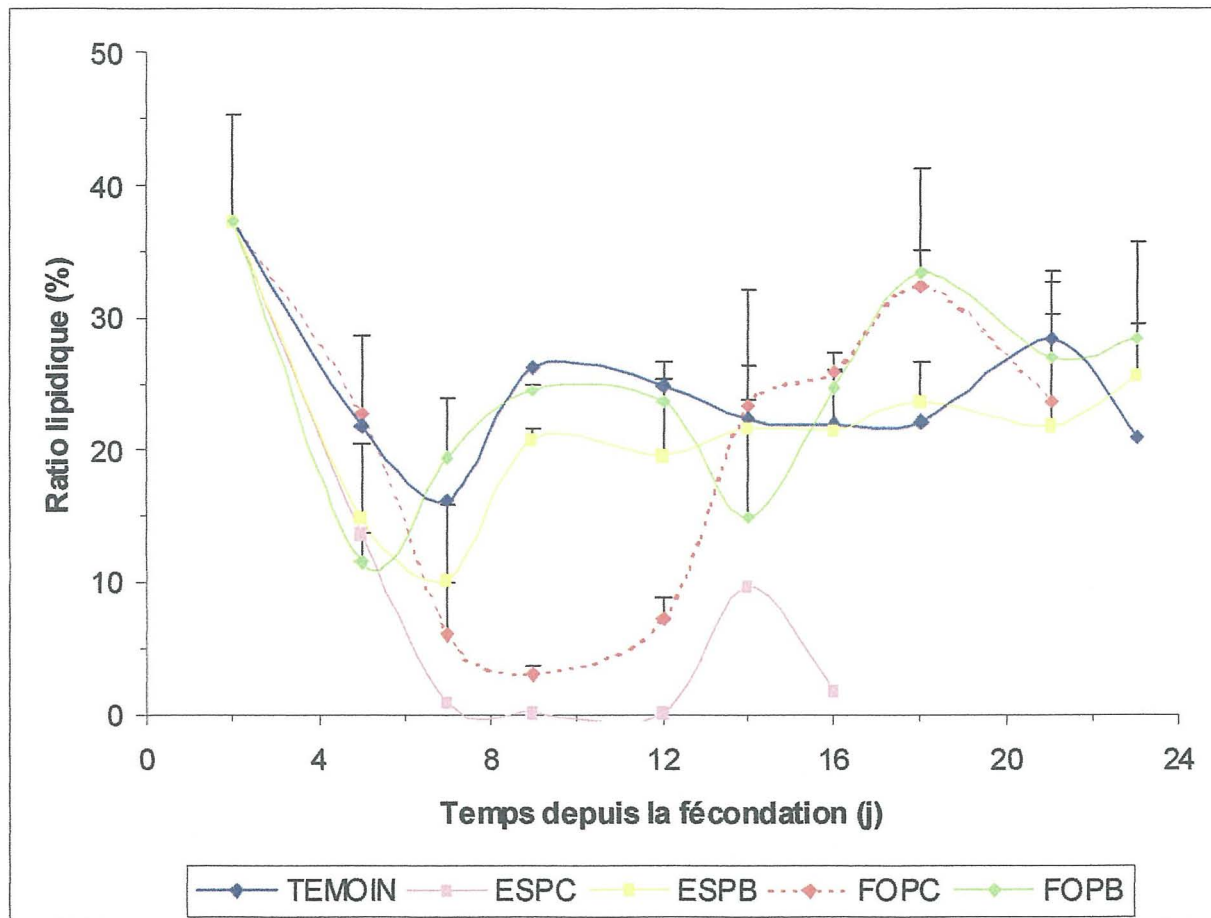


Figure 13 : Evolution de l'indice lipidique global chez des larves de *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentées avec *Isochrysis aff. galbana* et *Chaetoceros gracilis* produits en batch (PB) ou en continu (PC). Le témoin positif correspond à un élevage conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch).

Les variations de cet indice lipidique global sont corroborées par celles du rapport biochimique TAG/ST où les conditions ESPC et FOPC se traduisent par de faibles valeurs (2 et 4) tandis que pour les autres conditions ce rapport est compris entre 5 et 7 à l'exception d'une seule donnée (FOPB au 14^e j : Figure 14).

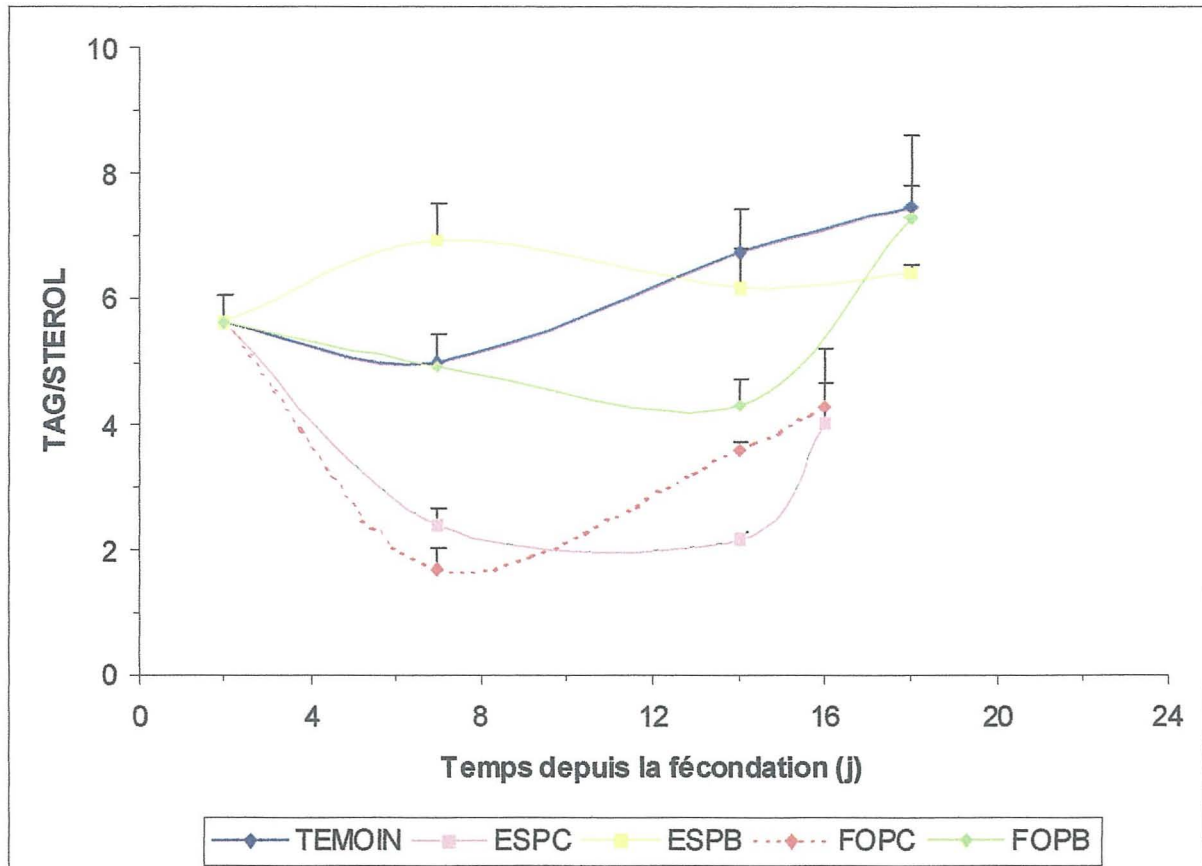


Figure 14 : Evolution du rapport teneur en triacylglycérides (TAG : lipides de réserve)/teneur en stérols (ST : lipides de structures) chez des larves de *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentées avec *Isochrysis aff. galbana* et *Chaetoceros gracilis* produits en batch (PB) ou en continu (PC). Le témoin positif correspond à un élevage conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch).

L'état physiologique des larves de *C. gigas* à travers l'indice lipidique global et/ou l'indice biochimique montre que la condition ESPC était particulièrement stressante et que les larves n'ont pas ou peu constitué de réserves. De ce fait elles ont peu grandi et n'ont pu atteindre la métamorphose au bout de 3 semaines d'élevage. Un tel stress est également mis en évidence pour la condition FOPC au cours de la première semaine d'élevage mais une bonne récupération est observé ultérieurement. Un problème de qualité du phytoplancton produit en continu se dégage de façon claire, problème fortement exacerbé lorsque l'eau d'élevage est faiblement renouvelée (ES). En fait une contamination d'*Isochrysis affinis galbana* par une autre microalgue de type *Gymnodinium* a été constatée et bien que le rapport de concentration entre les deux soient faibles elle a pu fortement interférer sur la qualité de la production globale.

On dégage par ailleurs qu'en élevage séquentiel l'apport de petites diatomées dans le régime nutritionnel est avantageux par rapport à des diatomées de plus grandes taille tout au long de l'élevage. Ainsi l'adjonction dans le régime bispécifique de *Chaetoceros calcitrans forma pumilum* (Témoin) dont le volume cellulaire est environ deux fois moindre que celui de *C. gracilis* (ESPB, Robert et al., 2004) autorise une meilleure croissance larvaire (14.6 vs $12 \mu\text{m j}^{-1}$), une plus forte compétence (75 vs 55%) mais curieusement une moindre métamorphose (47 vs 90%). L'évolution des indices de qualité larvaire ne permet pas d'explicitier clairement ces différences. Il en est de même avec la condition FOPB où la croissance et la compétence

larvaire sont particulièrement fortes ($15 \mu\text{mj}^{-1}$, 100% et la métamorphose la plus faible (13%). Il est probable qu'une mauvaise estimation de la métamorphose soit à l'origine de ce problème.

3.2.2.2. Gig. 0610

Au cours de cette expérimentation trois conditions n'ont pu être menées à terme, l'une pour une raison inexplicée (témoin positif 1) et deux autres recevant *Chaetoceros gracilis* produite en photobioréacteur. Les mortalités larvaires apparaissent rapidement dans les élevages conduits en séquentiel (70% après 5 jours d'alimentation, J12, sur la seule *C. gracilis*) mais sont différées en flux ouvert (95% à J19 : Tableau 6).

Par contre, les larves recevant la seule *C. gracilis* dès le stade D présentent une bonne survie (82% en fin d'élevage à J19). Par contre, la compétence est peu élevée (26%) et se traduit par une moindre métamorphose (32% : Tableau 6). La meilleure performance larvaire est enregistrée pour la condition FOPB c'est à dire pour des larves élevées en flux ouvert et alimentée avec *C. gracilis* produite en batch avec 79% de survie en fin d'élevage, 70 % de larves compétente qui se traduisent par un taux de métamorphose de 56% (Tableau 6). Les larves recevant la même origine de nourriture mais élevées de façon traditionnelle, c'est à dire en séquentiel présentent des performances intermédiaires avec cependant une meilleure survie larvaire (87% : Tableau 6)

Tableau 6 : Durée de l'élevage larvaire, survie, compétence et métamorphose chez *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *Chaetoceros gracilis* produite en batch (PB) ou en continu (PC).

	Fin de l'élevage larvaire (j)	Survie J 12 (%)	Survie J 19 (%)	Compétence larvaire (%)	Taux de métamorphose (%)
Témoin 1 (TCp)	19 : éliminé	88,7 (7,9)	61,4 (27,1)	nd	nd
Témoin 2 (C. gracilis permanent)	21	93,9 (3,8)	81,7 (9,5)	26,0 (4,6)	32,3 (11,7)
ESPC	19 : éliminé	91,5 (3,2)	5,4 (0,2)		
ESPB	19	90,2 (5,1)	87,2 (2,2)	47,1 (5,0)	46,8 (6,4)
FOPC	12 : éliminé	33,4 (2,5)	---	---	---
FOPB	16	86,3 (1,9)	78,7 (4,3)	69,1 (5,2)	56,1 (14,3)

La plus faible croissance est observée chez les larves témoin 2 nourrie dès le stade D avec la seule *C. gracilis* avec une croissance globale de $7,8 \mu\text{mj}^{-1}$ (Figure 15). Par contre, celles élevées en flux ouvert ou en séquentiel mais alimentées avec *C. gracilis* produite en continu (FOPC et FOPB) présentent un ralentissement marqué de leur croissance au changement de régime nutritionnel, au 7^e jour, avec une croissance globale, sur les dix premiers jours d'élevage de $9,9 \mu\text{mj}^{-1}$. Ce taux de croissance est similaire à celui obtenu en séquentiel avec des algues produites en batch (ESPB : $10 \mu\text{mj}^{-1}$, Figure 15) mais dont l'élevage a pu être

conduit à terme. Le meilleur développement est obtenu en flux ouvert et algues produites en batch avec $15,2 \mu\text{m}j^{-1}$ (FOPB). La quasi absence de croissance observée chez les larves non alimentées ($0,5 \mu\text{m}j^{-1}$) confirme l'absence d'apport nutritionnel exogène.

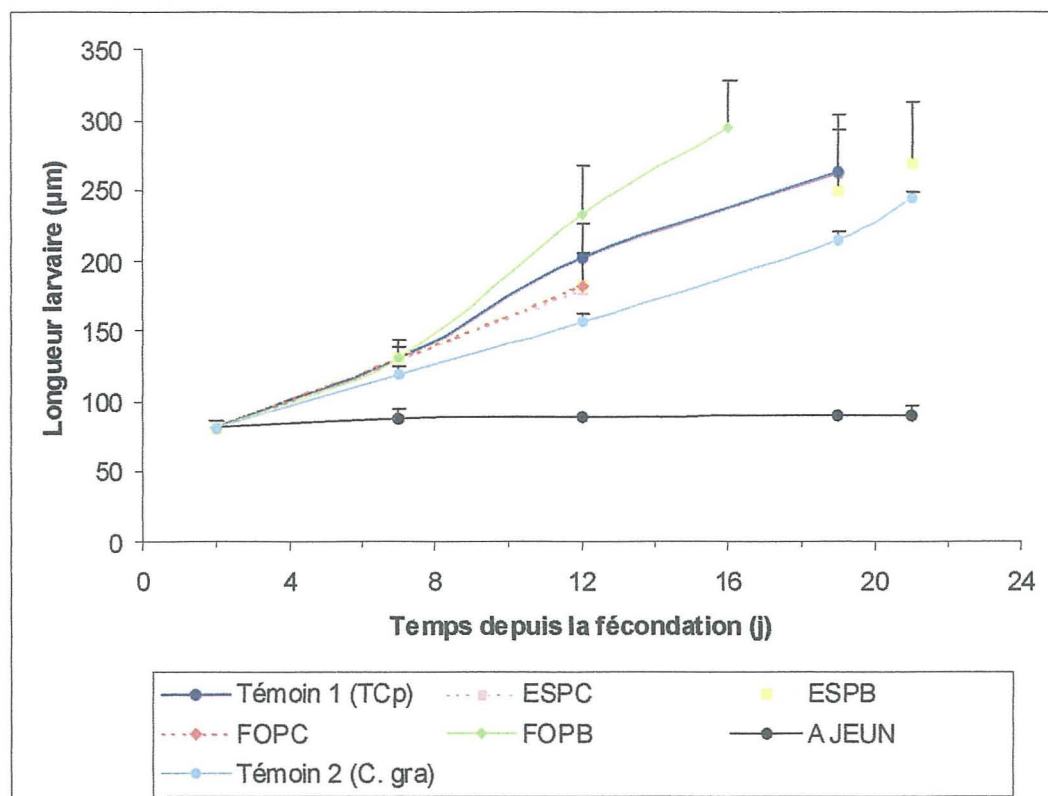


Figure 15 : Croissance larvaire de *C. gigas* élevée en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *Chaetoceros gracilis* produit en batch (PB) ou en continu (PC) à partir du 7^e jour d'élevage. Le témoin positif (Témoin 1) correspond à un élevage conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch) tandis que le témoin négatif n'est pas alimenté (A JEUN). Un autre témoin positif (Témoin 2) reçoit dès le stade larve D *Chaetoceros gracilis* produit en batch.

Au cours de cette expérimentation des résultats plus cohérents sont obtenus au niveau des performances du développement puisque la meilleure croissance larvaire est acquise chez les élevages nourris à partir de phytoplancton produit en batch et conduits en flux ouvert ($15,2 \mu\text{m}j^{-1}$) qui présentent également les taux les plus élevés de compétence larvaire (70%) et de métamorphose (56%). L'influence de la seule technique d'élevage larvaire se dégage ici clairement puisque les larves élevées en flux ouvert et recevant le même type de nourriture que l'élevage en séquentiel présente un cycle d'élevage plus court (16j vs 21j) pour une survie similaire et un taux de compétence et métamorphose légèrement supérieurs en flux ouvert. L'importance d'une alimentation équilibrée et/ou basée sur l'apport d'une petite diatomée en début d'élevage se dégage également ici puisque le témoin 2 exclusivement nourri sur *C. gracilis* dès le stade larve D présente globalement un développement moindre que la condition ESPB ($7,8 \mu\text{m}j^{-1}$ vs $9,9 \mu\text{m}j^{-1}$, compétence 26% vs 47% et métamorphose 32% vs 47%) pour une survie similaire (82 vs 85%).

En ce qui concerne l'indice lipidique global on note un effondrement du rapport surface lipidique/superficie de la larve maintenue à jeun avec des valeurs passant de 52% au jour 2 à 0

au 12^e jour (Figure 16). Pour les larves alimentées cette consommation de réserve lipidique est également observée jusqu'au 12^e jour mais de façon moindre. Ultérieurement, excepté chez les larves alimentées avec *C. gracilis* produite en batch dès le début de l'élevage (Témoin 2) ou au bout d'une semaine (ESPB) les réserves continuent à s'épuiser pour n'occuper qu'environ 10% de la surface totale de la larve (Témoin 1 et FOPB : Figure 16). Il n'y a pas ici de corrélation entre performance du développement larvaire et niveau de réserve exprimé par cet indice lipidique global puisque pour des valeurs comprises entre 30 et 40% en fin d'élevage les taux de métamorphose sont de l'ordre de 30 à 50% et de 60% environ pour une aire lipidique n'occupant que 10% de la surface totale. Pour cette même valeur l'élevage témoin 1 n'a pu être mené à terme (Figure 16).

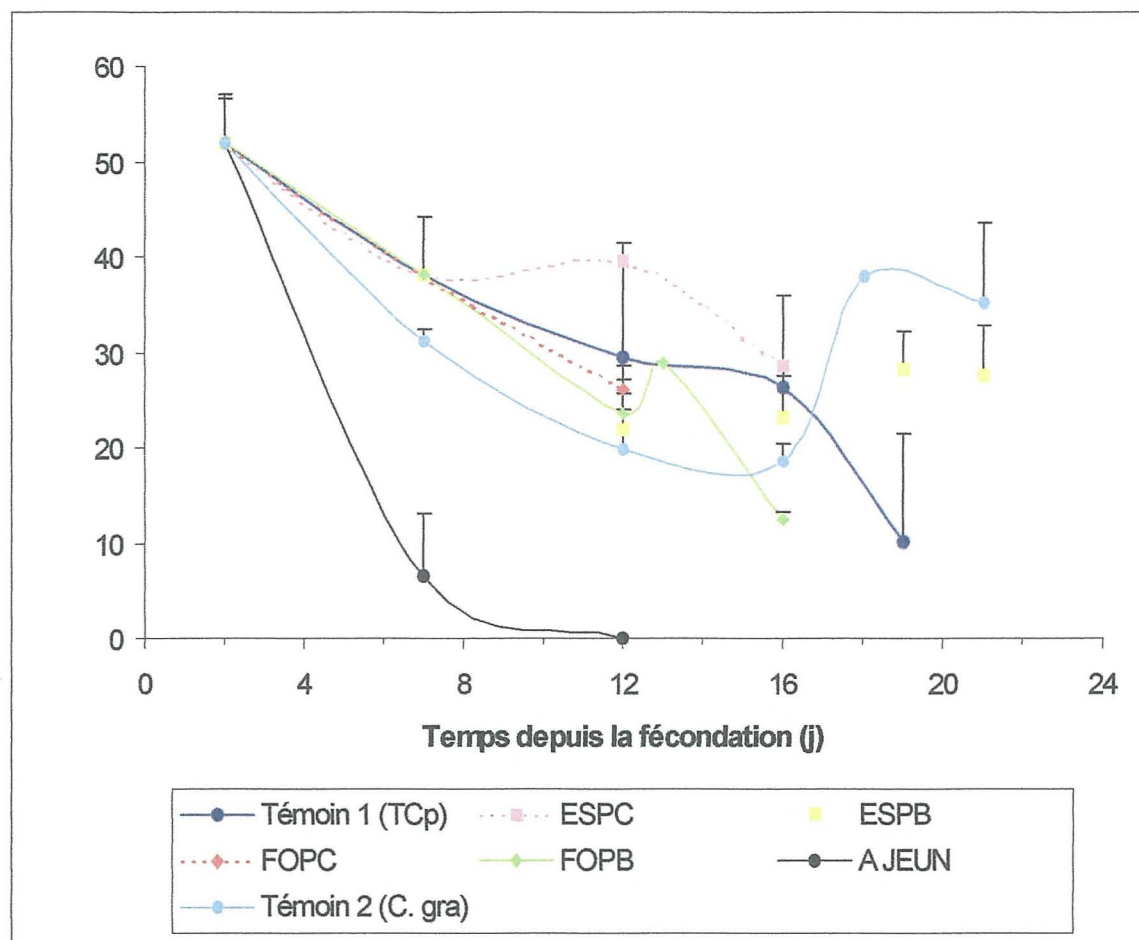


Figure 16 : Evolution de l'indice lipidique global chez des larves de *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentées avec *Chaetoceros gracilis* produits en batch (PB) ou en continu (PC). Le témoin positif correspond à un élevage conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch).

Les variations de cet indice lipidique global ne suivent pas celles du rapport biochimique TAG/ST excepté pour la condition ESPB qui présente une chute notable jusqu'au 12^e jour avec une valeur inférieure à 3 puis une récupération ultérieure. ESPC montre une augmentation régulière de 4 à 8 au 12^e jour tandis que FOPB reste constant avec une valeur comprise entre 4 et 5 (Figure 17).

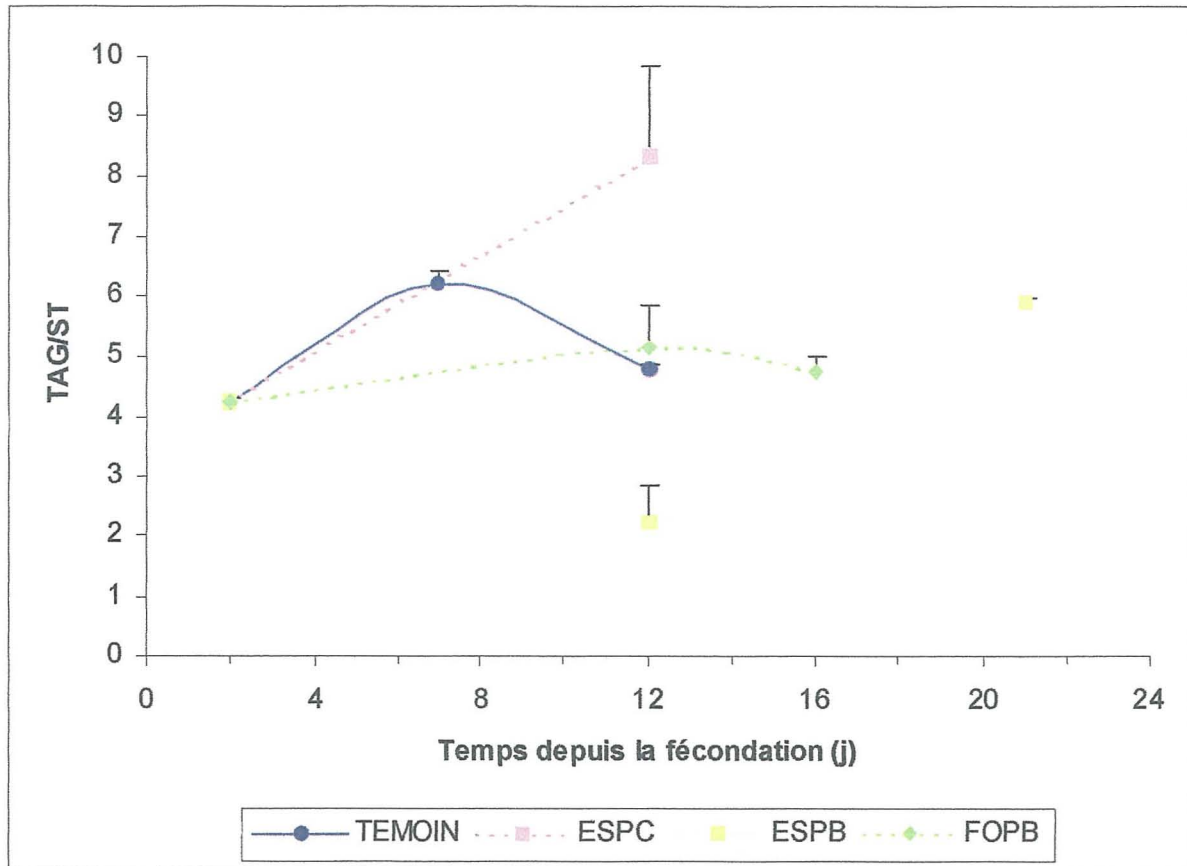


Figure 17 : Evolution du rapport teneur en triacylglycérides (TAG : lipides de réserve)/teneur en stérols (ST : lipides de structures) chez des larves de *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentées avec *Chaetoceros gracilis* produits en batch (PB) ou en continu (PC). Le témoin positif correspond à un élevage conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch).

Autant les descripteurs zootechniques classiques mettent en évidence un certain nombre de différences fortes entre conditions expérimentales, autant au cours de cette expérimentation il est difficile de les relier de façon fiable aux variations des indices de qualité. Ainsi FOPB qui présente les meilleures performances de développement larvaire montre une forte consommation de ses réserves lipidiques à travers l'indice global puisque le pourcentage de surface occupée passe progressivement de 52 à 12 % du 2^e au 16^e jour alors que l'indice TAG/ST reste constant entre 4 et 5. A l'inverse, pour ESPB on note une moindre performance du développement qui s'accompagne pendant les 12 premiers jours par une consommation similaire de ses réserves lipidiques à travers l'indice global mais aussi à travers l'indice TAG/ST puis une récupération est observée ultérieurement ($\approx 30\%$ pour la surface lipidique et un ratio triacylglycérides sur stérols ≈ 6) qui ne se traduit pas par de meilleures performances à la métamorphose.

3.2.2.3. Gig. 0611

Seule la condition ESPC (Elevage Séquentiel alimenté à partir de Phytoplancton produit en Continu) n'a pu être conduit à terme car il présentait 55 % de mortalité au 19^e j et que dans ces conditions la métamorphose en serait altérée (Tableau 7). Avec une survie de 66% au 14^e jour l'élevage témoin n'a pu être conduit avec succès au delà en raison d'un forte mortalité larvaire

probablement lié à une contamination bactérienne (Tableau 7). Pour les élevages conduits en flux ouvert les survies étaient importantes de l'ordre de 92% au 19^e j avec des différences marquées en terme de compétence et taux de métamorphose en fonction de l'origine de la nourriture (Tableau 7). Ainsi, la qualité du phytoplancton produit en continu ne génère au 22^e j que 30% de larves compétentes qui se traduisent par un taux modeste de métamorphose également de l'ordre de 30%. A l'inverse, le phytoplancton produit en batch autorise un meilleur développement puisque 75 % de larves compétentes sont dénombrées dès le 19^e j qui donnent naissance à 70% de postlarves le 23^e j. En ce qui concerne les élevages conduits en séquentiel et quelle que soit l'alimentation de départ (*Chaetoceros calcitrans forma pumilum* ou *C. gracilis*) les performances de développement sont quasi similaires avec des survies comprises entre 64 et 74 % le 19^e j des compétences larvaires de 43 à 45% générant des taux de métamorphose de 36 à 42 % (Tableau 6).

Tableau 7 : Durée de l'élevage larvaire, survie, compétence et métamorphose chez *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *Chaetoceros gracilis* produite en batch (PB) ou en continu (PC). PB1 correspond à un apport de *C. gracilis* dès le 2^e j tandis que PB2 correspond à un apport de *C. gracilis* dès le 7^e j. Dans ce cas les larves sont nourries la première semaine comme le témoin avec le régime standard TCp (*Isochrysis affinis galbana* et *Chaetoceros calcitrans forma pumilum*)

	Fin de l'élevage larvaire (j)	de Survie J 14 (%)	larvaire Survie J 19 (%)	Compétence en fin d'élevage larvaire (%)	Taux de métamorphose (%)
TEMOIN		66,0 (10,9)	***	***	***
ESPC	19 : éliminé	82,8 (8,7)	46,2 (27,0)	***	***
ESPB1	19	67,5 (5,4)	63,9 (7,4)	42,7 (8,6)	42,2 (4,3)
ESPB2	19	80,6 (0,8)	73,4 (7,3)	44,7 (11,7)	35,7 (10,9)
FOPC	22	95,2 (2,4)	91,9 (0,8)	28,7 (4,4)	27,2 (8,0)
FOPB	19	94,3 (2,3)	91,9 (2,6)	74,7 (5,4)	71,1 (4,3)

La plus faible croissance est observée chez les larves conduites en séquentiel et alimentée avec *Chaetoceros gracilis* produite en continue. Une perte de valeur alimentaire est relevée à partir du 9^e jour de culture puisqu'au delà aucune croissance larvaire n'est enregistrée conduisant à un taux global de croissance de 3,4 $\mu\text{m.j}^{-1}$ (Figure 18). L'élevage en flux ouvert recevant du phytoplancton en continu présente un taux de croissance de 8,5 $\mu\text{m.j}^{-1}$, celui-ci passant à 12,7 $\mu\text{m.j}^{-1}$ en présence de phytoplancton en batch (Figure 18). En ce qui concerne les élevages en séquentiel les croissances sont là encore similaires avec des taux de croissance voisin de 11 $\mu\text{m.j}^{-1}$ (Figure 18).

En ce qui concerne l'indice lipidique global on note un effondrement du rapport surface lipidique/superficie de la larve dans toutes les conditions (Figure 19). Celui-ci est particulièrement marqué pour la condition ESPC avec un rapport passant progressivement de 57 à 4 % du 2^e au 19^e jour d'élevage (Figure 19). Cette consommation est également marquée dans les autres conditions jusqu'au 16^e jour avec des valeurs comprises entre 20 et 30% qui se stabilisent ultérieurement (Figure 19). Hormis ESPC dont le faible développement larvaire peut être associé à une très forte consommation des réserves lipidiques, il est difficile de relier

l'évolution de cet indice lipidique global pour les autres conditions expérimentales où pourtant des performances très contrastées ont été relevées (e.g FOPB et FOPC).

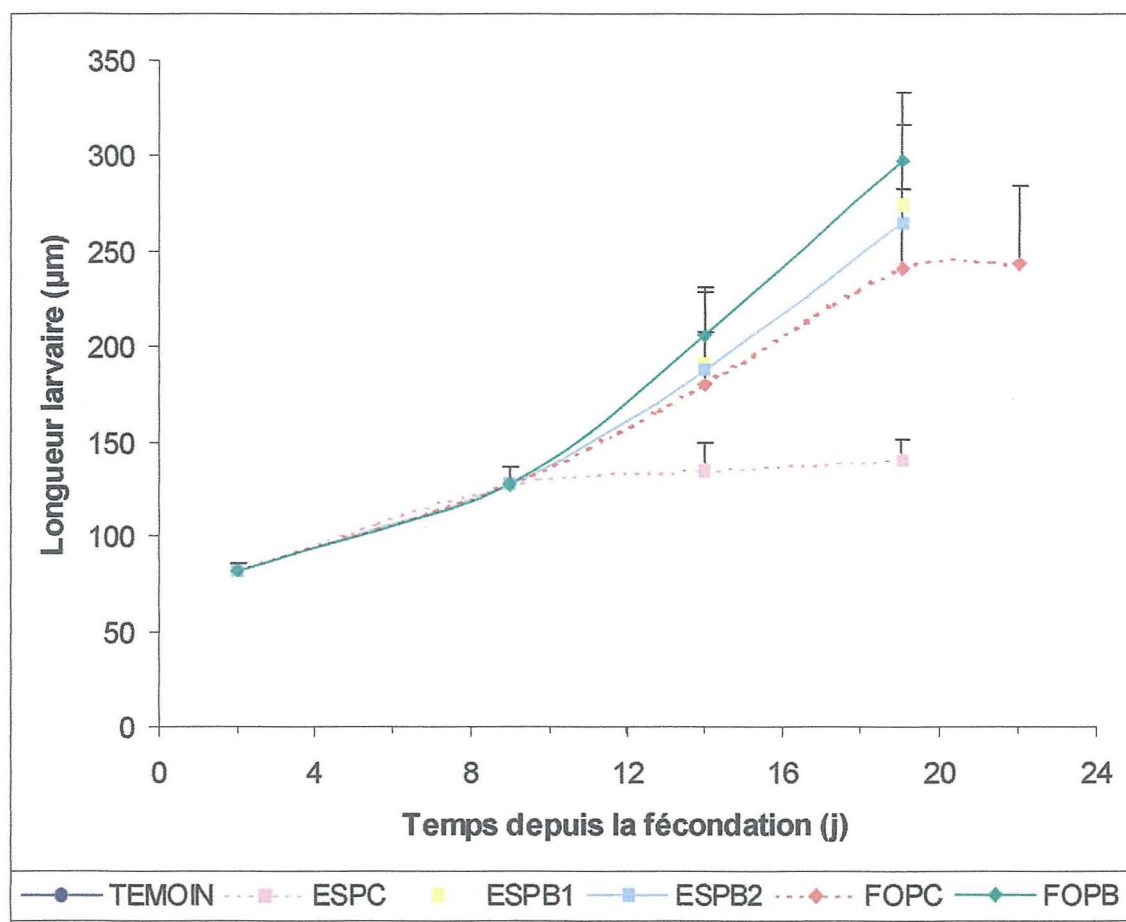


Figure 18 : Croissance larvaire de *C. gigas* élevée en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentée avec *Chaetoceros gracilis* produits en batch (PB) ou en continu (PC). PB1 correspond à un apport de *C. gracilis* dès le 2^e j tandis que PB2 correspond à un apport de *C. gracilis* dès le 7^e j. Dans ce cas les larves sont nourries la première semaine comme le témoin avec le régime standard TCp (*Isochrysis affinis galbana* et *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum*)

L'évolution du rapport TAG/ST est là encore difficile à relier aux performances d'élevage larvaire. Ainsi ESPB1 présente les plus faibles valeurs comprises entre 4 et 6 tandis que FOPC montre une accumulation préférentielle de TAG conduisant à de fortes valeurs de cet indice biochimique passant de 5 à 9 du 2 au 21^e jour (Figure 20).

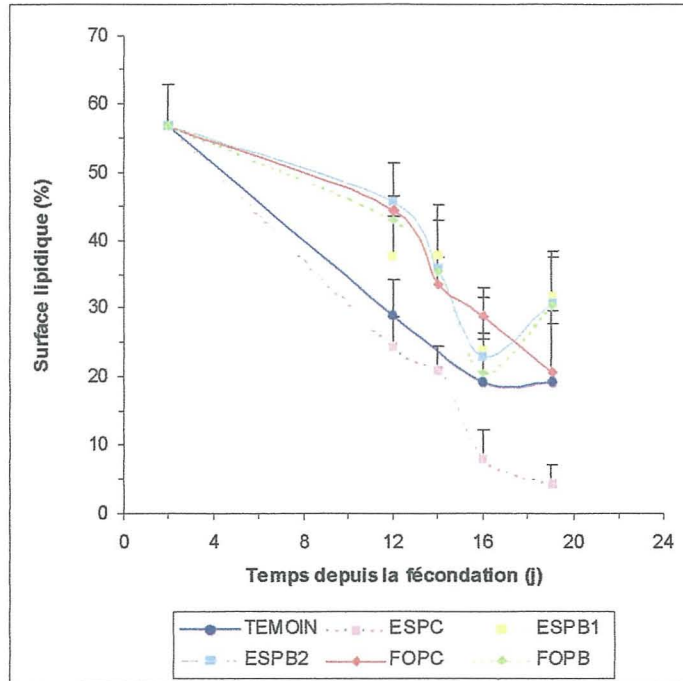


Figure 19 : Evolution de l'indice lipidique global chez des larves de *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentées avec *Chaetoceros gracilis* produits en batch (PB) ou en continu (PC). PB1 correspond à un apport de *C. gracilis* dès le 2^e j tandis que PB2 correspond à une à un apport de *C. gracilis* dès le 7^e j. Dans ce cas les larves sont nourries la première semaine comme le témoin avec le régime standard TCp (*Isochrysis affinis galbana* et *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum*)

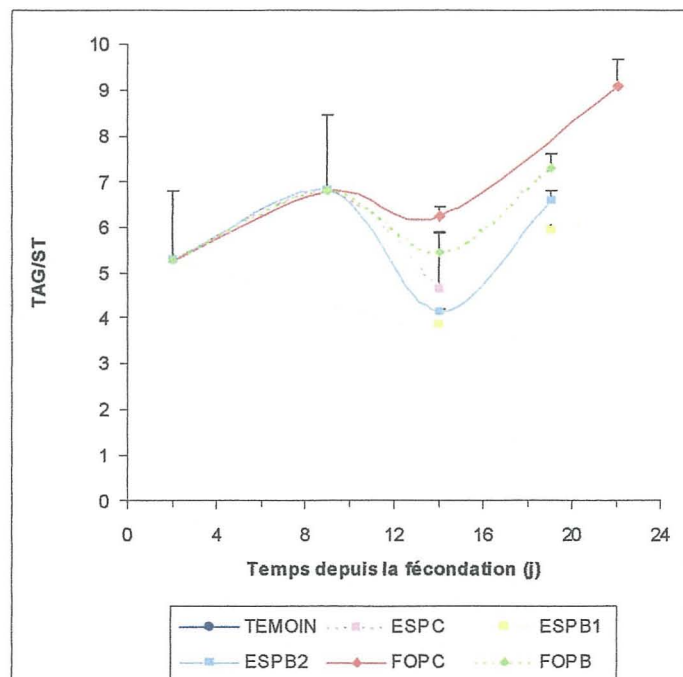


Figure 20 : Evolution du rapport teneur en triacylglycérides (TAG : lipides de réserve)/teneur en stérols (ST : lipides de structures) chez des larves de *C. gigas* élevées en séquentiel (S) ou en flux ouvert (FO) et alimentées avec *Chaetoceros gracilis* produits en batch (PB) ou en continu (PC). Le témoin positif correspond à un élevage conduit selon un procédé standard (séquentiel avec un apport TCp cultivé en batch).

4. Développement du photobioréacteur d'écloserie commerciale et des périphériques associés

4.1. Développement du pilote

Depuis deux années, les travaux portant sur le développement d'un photobioréacteur de production de microalgues en continu ont permis (1) de faire le point sur l'état de l'art des photobioréacteurs existants et (2) de proposer une géométrie innovante, permettant d'améliorer les performances de l'outil, pour laquelle un modèle prédictif de productivité a été établi.

4.1.1. Etudes expérimentales

Les études expérimentales, menées cette année dans le cadre de la thèse CIFRE pilotée par la société JOUIN SOLUTIONS PLASTIQUES, ont consisté (1) dans l'étude des transferts gaz-liquide au sein du photobioréacteur, pour différentes configurations hydrodynamiques (A : classique, B et C : objets de l'étude) et différents types d'injecteurs d'air et (2) dans la caractérisation des performances biologiques des configurations de photobioréacteur proposées.

4.1.1.1. Etude des transferts gaz-liquide

La méthode de désoxygénation/réoxygénation utilisée consiste dans un premier temps, à substituer l'oxygène dissous par de l'azote (étape de désoxygénation du milieu) et, à suivre ensuite la remontée en oxygène après remise en fonctionnement de l'injecteur d'air.

Le bilan de matière en O₂ dissous lors de la remontée en oxygène conduit à une égalité entre les termes d'accumulation et de transfert de matière gaz-liquide pour un réacteur parfaitement agité :

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C)$$

Équation 1

où C est la concentration en oxygène dissous (mg.L⁻¹), C* la concentration en oxygène dissous à saturation (mg.L⁻¹).

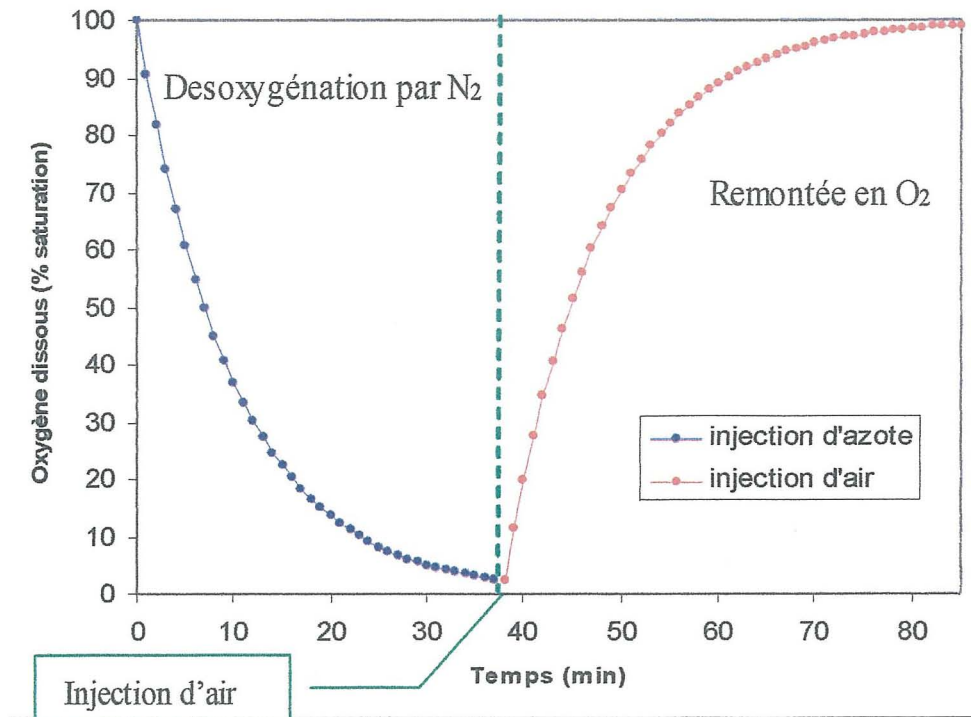


Figure 21 principe de la méthode de désoxygénation/réoxygénation

En intégrant l'Équation 1, la relation suivante est obtenue :

$$\ln(C^* - C) = -k_L a (t - t_0) + \ln(C^* - C_0)$$

Équation 2

avec, C_0 la concentration en oxygène dissous au moment où l'air est injecté soit à $t_0 = 0$.

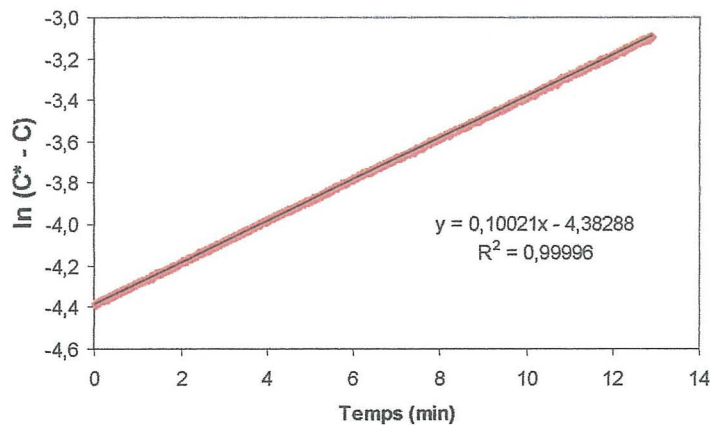


Figure 22 exemple de détermination expérimentale du $k_L a$ à partir de l'Équation 2.

Le coefficient volumique de transfert en oxygène ($k_L a$) est déterminé à partir de la pente de la droite reliant $\ln(C^*-C)$ au temps (Figure 22). La littérature préconise de calculer cette pente pour les concentrations en oxygène dissous comprises entre 20 et 80% (Roustan 2003).

Cette étude a pour but de caractériser les échanges gazeux (transferts de matière gaz-liquide) au sein de la maquette afin de quantifier les performances d'aération du photobioréacteur.

Le coefficient volumique de transfert d'oxygène $k_L a$ a été déterminé pour différents débits d'air, et types de configurations. Les expériences dont les résultats sont présentés ici, ont été réalisées par B. Aubry au cours de son stage de 1^{ère} année de Master Génie des Procédés de l'Université de Nantes (Aubry 2006).

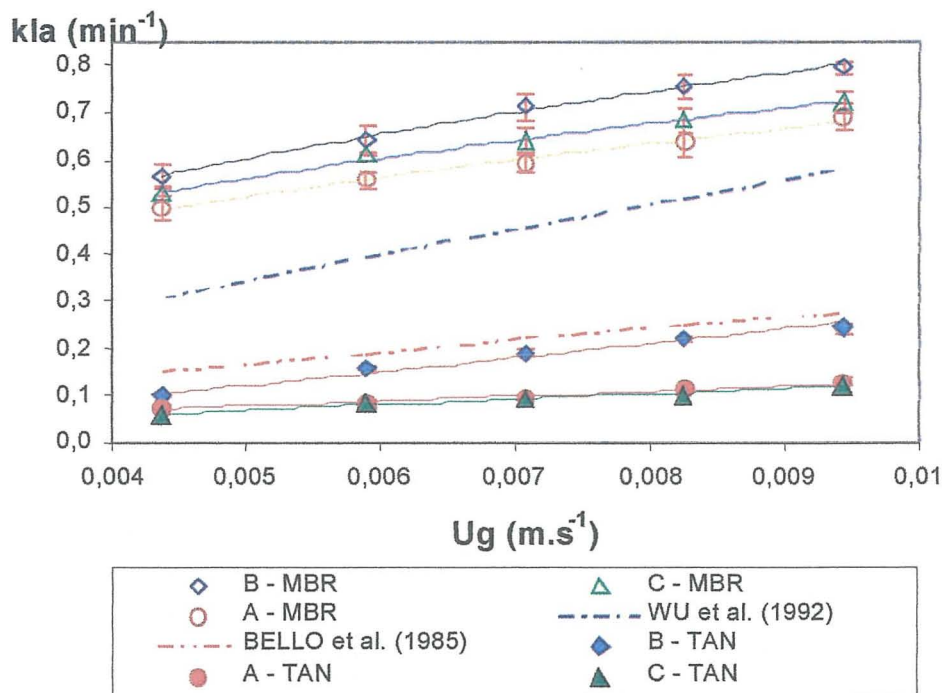


Figure 23: Evolution du coefficient volumique de transfert gaz-liquide ($k_L a$) en fonction de la vitesse d'injection (U_g) de l'air dans le cas où la phase liquide est le milieu de culture.

Les valeurs de $k_L a$ obtenues sont rassemblées sur la Figure 23 pour les configurations suivantes : deux distributeurs d'air (membranaire, noté MEN et tangentiel, noté TAN), trois hydrodynamiques (notées A, B et C) et cinq débits d'air.

En tout premier lieu, il est à noter que, quels que soient le milieu liquide, l'hydrodynamique ou le type de distributeur d'air, les faibles vitesses superficielles de gaz sont inférieures à quelques cm.s⁻¹, le régime d'écoulement est donc plutôt homogène. Dans ces conditions, la relation liant le $k_L a$ à la vitesse superficielle du gaz U_g s'exprime classiquement sous la forme suivante (Wu *et al.* 1992) :

$$k_L a = \alpha U_g^\beta, \text{ avec, } U_g = \frac{Qg}{\pi R^2}$$

Équation 3

Tableau 8: Coefficients α et β caractérisant l'évolution du $k_L a$ (min^{-1}) en fonction de la vitesse superficielle du gaz (m.s^{-1}) dans le cas où la phase liquide est le milieu de culture. B et C représentent deux configurations de photobioréacteur générant une hydrodynamique particulière selon deux modalités. A correspond à une configuration hydrodynamique classique

Configuration	alpha	beta
MBR, A	4,67	0,41
MBR, B	6,45	0,45
MBR, C	4,65	0,39
TAN, A	3,35	0,70
TAN, B	59,19	1,16
TAN, C	6,55	0,86

Le Tableau 8 présente les valeurs des coefficients α et β issus de l'Équation 3.

Il est très difficile de tirer des conclusions quantitatives de ce tableau. Cependant, il est intéressant de remarquer, que pour un même type de distributeur, β demeure constant ($\sim 0,42$ pour MBR et $\sim 0,90$ pour TAN).

De manière globale, la Figure 23 montre qu'un distributeur membranaire offre un meilleur transfert gaz-liquide qu'un distributeur tangentiel : en eau de mer et en milieu de culture, le $k_L a$ est de 4 à 7 fois supérieure en injection membranaire qu'en injection tangentielle. Cela s'explique par le fait que cette injection génère des bulles beaucoup plus petites en taille et beaucoup plus nombreuses, augmentant ainsi l'aire d'échange.

Effectivement, une augmentation de la rétention gazeuse ε_G (rapport entre le volume de gaz et le volume total) est observée visuellement en injection membranaire. Elle est estimée globalement (méthode des différences de hauteurs de liquide avec et sans gaz) autour de 0,1 avec le distributeur membranaire et autour de 0,08 avec le distributeur tangentiel.

Il est également intéressant de remarquer que l'hydrodynamique peut améliorer les capacités de transfert : on relève, selon l'hydrodynamique, des gammes de $k_L a$ variant de $0,09-0,25 \text{ min}^{-1}$ à $0,07-0,13 \text{ min}^{-1}$. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'un meilleur mélange donne une meilleure disponibilité des surfaces des bulles au transfert d'oxygène.

Cette étude a montré que, quel que soit le type de distributeur, les performances d'aération au sein du réacteur étudié se traduisent par des coefficients volumétriques de transfert compris entre $0,1$ et $0,8 \text{ min}^{-1}$ (en milieu de culture et pour l'hydrodynamique retenue). La quantité d'oxygène qui peut être transférée du gaz vers la phase liquide s'exprime selon :

$$N_{O_2} = k_L a V_{\text{réacteur}} (C_{O_2}^* - C_{O_2 \text{ résiduel}})$$

Des études réalisées au laboratoire PBA (Aubry 2006) ont montré que, dans une enceinte à condition contrôlée de type OXYLAB (Hansatech), la production d'oxygène photosynthétique par t-Iso est de $6 \cdot 10^{-10}$ $\mu\text{mol d'oxygène} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ pour une irradiance de $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Dans ces conditions de lumière, la concentration de biomasse mesurée est de $4,5 \cdot 10^{10} \text{ cell} \cdot \text{l}^{-1}$, ce qui donne une production en oxygène de $27 \mu\text{mol d'oxygène} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$. Si cette production est ramenée au volume de la maquette ($V = 6,1 \text{ L}$), une production approximative de $164,7 \mu\text{mol d'oxygène} \cdot \text{min}^{-1}$ peut être estimée soit $5,27 \text{ mg d'oxygène} \cdot \text{min}^{-1}$.

Il est intéressant de comparer cette quantité approximative d'oxygène, produite par photosynthèse, à la capacité de transfert du réacteur. Dans le pire des cas (lorsque le plus petit $k_L a$ obtenu est considéré : $k_L a = 0,1 \text{ min}^{-1}$) et en considérant $C_{\text{O}_2 \text{ résiduel}} = 0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, $V = 6,1 \text{ L}$, $C_{\text{O}_2, 25^\circ\text{C, eau de mer}}^* = 6,9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, la quantité d'oxygène transférable dans le réacteur est de $0,69 \text{ g d'oxygène} \cdot \text{min}^{-1}$. Ceci est bien supérieur aux $5,27 \cdot 10^{-3} \text{ g d'oxygène} \cdot \text{min}^{-1}$ estimés produits par la photosynthèse (rapport ~ 130). En conséquence, ce calcul rapide montre que la maquette a largement les capacités d'évacuer cet oxygène issu de la photosynthèse, la croissance des microalgues t-Iso ne sera donc pas limitée par ce facteur.

4.1.1.2. Etude des performances biologiques

Les études de performances biologiques du photobioréacteur ont consisté à caractériser le niveau de performance réel et à comparer les performances des deux configurations hydrodynamiques retenues.

Pour que l'impact de l'hydrodynamique du photobioréacteur sur la productivité des cultures puisse être réellement étudié, il est nécessaire que l'irradiance soit le seul facteur limitant pour le taux de croissance, la réponse de la culture ne devant pas être biaisée par des paramètres environnementaux contrôlables en laboratoire (température, pH, débit d'air, nutriments). Les paramètres suivants de culture sont contrôlés : la température est régulée à 27°C et le pH de 7,2 par injection de CO_2 . D'après Zittelli *et al.* (2000), la productivité est alors conditionnée uniquement par l'irradiance reçue et par la quantité de nutriments disponible pour chaque cellule.

Dans le cas présent, la croissance est expérimentalement photolimitée : l'irradiance est le seul paramètre limitant au regard du flux incident de lumière imposé et de son atténuation au sein du photobioréacteur. D'après le modèle radiatif à deux flux l'irradiance G est de l'ordre de $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ en fond de réacteur ($z = 60 \text{ mm}$) pour un flux incident q_0 de $210 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Ainsi, il n'y a pas de zone sombre et on demeure bien en deçà du seuil de photoinhibition.

Expérimentalement, pour s'assurer qu'aucune limitation en nutriments n'existe, des essais biologiques ont été effectués dans lesquels la concentration en nutriments du milieu de Conway est fournie à une dose de 3 fois supérieure à la normale (notée C_{*3} , avec $S_{\text{N}*3} = 3,53 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ et $S_{\text{P}*3} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivement les concentrations initiales en azote et phosphate).

La pertinence des conditions de culture vérifiées, l'analyse des cultures en continu conduites dans les maquettes a pu être réalisée afin de quantifier la productivité obtenue et de comparer le potentiel de chaque configuration hydrodynamique. A noter que les productivités et

encrassements en conditions réelles sont associés à la durée des cultures en continu : dans les cas considérés, elle n'excède pas 40 jours.

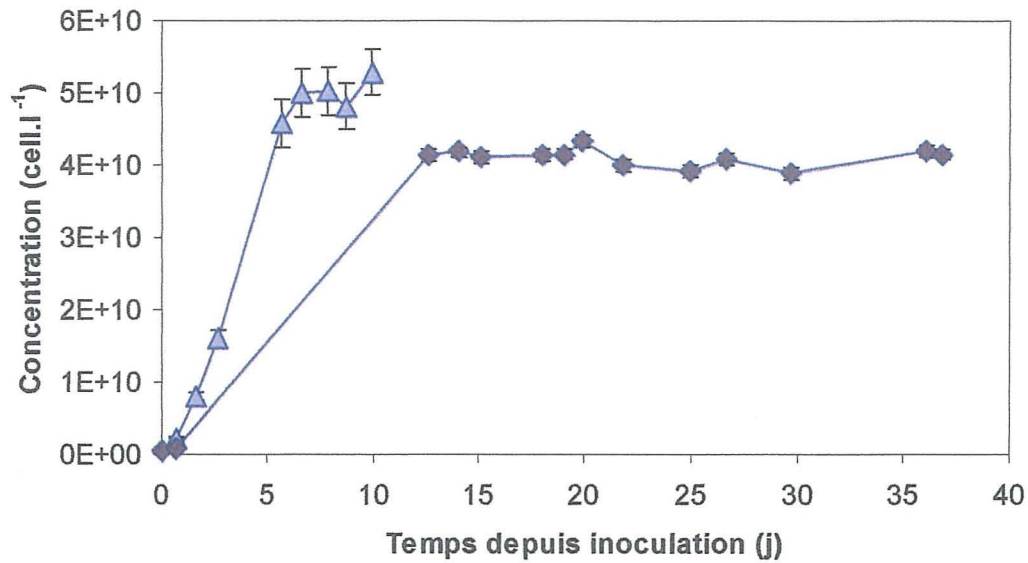
Tableau 9 productivité et variance σ associée ($\text{cell.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$) pour les deux hydrodynamiques testées (distributeur tangentiel, $1,4 \text{ NL.min}^{-1}$).

	A	B
Essai 1	$1,7614.10^{10}$	$1,724.10^{10}$
σ	$1,25.10^9$	$1,28.10^9$
Essai 2	n.d.	$1,361.10^{10}$
σ		$2,69.10^9$
Essai 3	$1,418.10^{10}$	$1,469.10^{10}$
σ	$2,52.10^9$	$2,83.10^9$

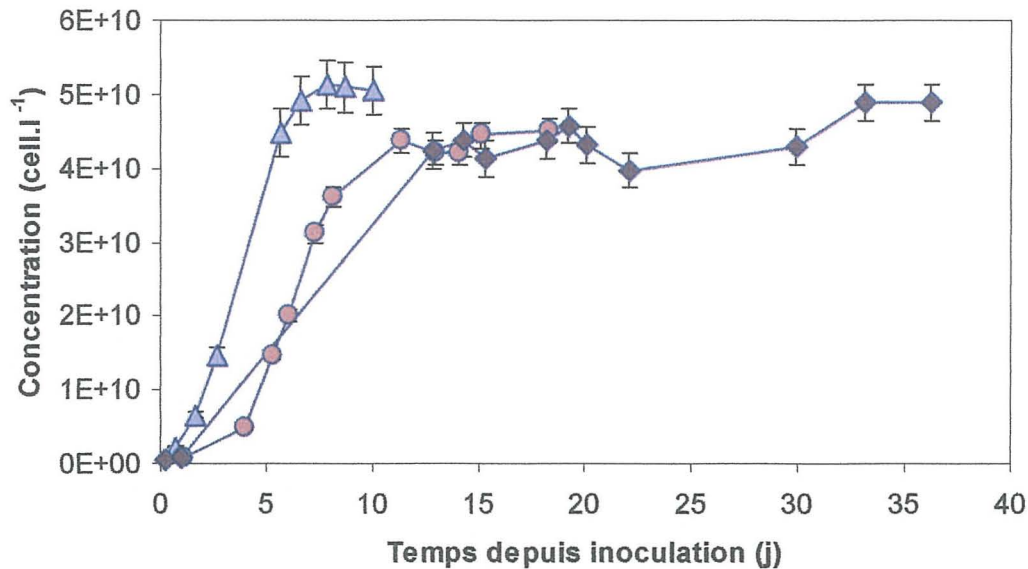
Ces résultats ont révélé que le photobioréacteur assure une productivité moyenne de $(1,59 \pm 0,19).10^{10} \text{ cell.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ avec la configuration hydrodynamique classique A et de $(1,52 \pm 0,26).10^{10} \text{ cell.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ avec la configuration hydrodynamique B (Tableau 9), pour un taux de dilution de $0,36 \text{ j}^{-1}$ et un flux incident de $260 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

L'analyse de variance des productivités permet de conclure qu'il n'y a pas de différence significative entre les réplicats de culture pour une même configuration du photobioréacteur (Figure 24). De même, cette analyse statistique montre qu'il n'existe pas de gain significatif de productivité, au niveau de confiance 95%, entre les deux configurations.

La différence observée entre la productivité expérimentale obtenue et la valeur prédite par le modèle antérieurement développé (pour $D = 0,36 \text{ j}^{-1}$ et $q_0 = 250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) voisine de $2,8.10^{10} \text{ cell.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ s'explique par des approximations utilisées dans le modèle : flux incident réel non colimaté, propriétés optiques non rigoureusement démontrées (calculées à partir de données bibliographiques).



(a)



(b)

Figure 24 cultures continues de t-Iso en mode chemostat (essai 1 (Δ), essai 2 (\circ) et essai 3 (\diamond) pour deux hydrodynamiques (a : objet de l'étude) et (b : classique). Conditions opératoires : milieu de Conway C^*_3 , distributeur d'air tangentielle, débit d'air $1,4 \text{ NL.min}^{-1}$, Irradiance de $250\text{-}260 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95%.

Les productivités enregistrées correspondent à un gain de l'ordre de 10 par rapport à la technique de batch utilisée dans les écloséries (concentration cellulaire maximale atteinte de $6 \cdot 10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$; durée de culture de 4 j). Ainsi, un réacteur de 100 L utiles, peut se substituer à un ensemble de plus de trois scobalits de 300 L et produire la biomasse nécessaire pendant plusieurs mois sans nécessiter les manipulations inhérentes à la culture en batch.

Au terme des 35 jours des cultures expérimentales, la nouvelle configuration hydrodynamique proposée a révélé un dépôt de biofilm nettement moindre que dans le cas de la configuration classique (Figure 25). Cette observation revêt une réelle importance dans le cas de cultures destinées à être maintenues dans le temps pour diminuer le coût de main d'œuvre ; la

formation de biofilm peut, en effet, être assimilée à une perte d'irradiance incidente avec comme conséquence une diminution progressive de la productivité des cultures.

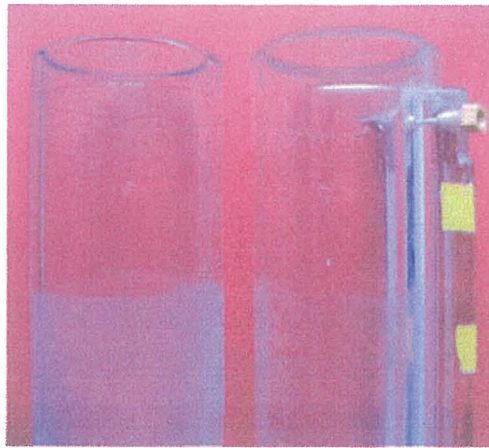


Figure 25 photographies de biofilm présent sur les tubes descendants des maquettes d'étude dans le cas de la configuration hydrodynamique proposée (à droite) et de la configuration classique (à gauche).

4.1.2. Spécifications du pilote

Le prototype, réalisé par la société JOUIN SOLUTIONS PLASTIQUES, est constitué d'une succession de modules élémentaires (boucles airlift) composés de deux tubes connectés par des pièces d'extrémité. Leur agencement a été conçu de façon à occuper le moins d'espace possible au sol, à faciliter son entretien (nettoyage, accessibilité pour la maintenance...), et à mettre en œuvre aisément des cultures en continu (stérilisation, alimentation et soutirage, régulation pH et température).

Le corps du photobioréacteur est constitué de 18 modules élémentaires, soit un total de 36 tubes (de 1 m de long et de 30 mm de rayon) et de 36 pièces de connexion. Son volume est de 120 litres.

La géométrie générale du photobioréacteur a été étudiée pour en réduire l'encombrement au sol : la solution retenue consiste en un agencement en « U » fixé sur un châssis de forme parallélépipédique de 1,65 m de haut, 1 m de large et 1,10 m de long. des injections d'air sont réalisées à la base d'un certain nombre de tubes afin de mettre en mouvement la culture, d'entretenir le mouvement et d'assurer que le débit d'air injecté ne provoque (par son volume) une dépression amenant un engorgement de la bride supérieur (accumulation d'air au sommet du tube ascendant).

L'éclairage est composé de 20 tubes fluorescents (SYLVANIA, LuxlinePlus, FHE 28W/T5/865), choisis pour leur faible coût (~5,5 €) et leur fort rendement. Grâce à des interrupteurs, il est possible de moduler l'irradiance sur deux niveaux, afin de ne pas provoquer de stress sur les cultures jeunes.

Les périphériques du photobioréacteur sont adaptés pour des cultures en continu, c'est-à-dire qu'ils fonctionnent à l'aide d'automates pour les mesures jugées indispensables telles que la régulation pH et la mesure de la température. Des fonctionnalités optionnelles, telles que l'acquisition en ligne sur PC des mesures des grandeurs mesurées, sont envisagées pour faciliter l'information de l'opérateur sur le déroulement des cultures.

A l'heure actuelle le milieu de culture est stocké dans une cuve de réserve mais des études parallèles ont montré que cette solution entraîne des risques élevés de contamination du photobioréacteur (apparition d'autres microalgues et de vibrios). Ainsi, un automate permettant la fabrication en ligne de milieu de culture est en cours de mise au point au laboratoire PBA dans le but d'être couplé au photobioréacteur pilote.

4.2. Développement des périphériques

Suite aux travaux conduits pendant l'année 2005 à la station expérimentale Ifremer d'Argenton, sur deux photobioréacteurs de 17-L, il était ressorti (1) que le transfert de la culture en continu vers les écloseries nécessite de résoudre les difficultés liées à la contamination du milieu de culture injecté dans les photobioréacteurs et (2) que la distribution des microalgues devrait être adaptée à la demande croissante des larves, au cours de l'élevage. Deux actions ont été initiées au cours de cette année 2006, afin de proposer des solutions techniques adaptées.

4.2.1. Reconstitution du milieu de culture en ligne

La pérennité d'une culture en continu, dans un photobioréacteur clos, dépend principalement de la capacité du système à opposer une barrière efficace et constante contre les sources de contamination extérieures. A ce sujet, plusieurs étapes sont déterminantes : la stérilisation initiale du photobioréacteur, l'inoculation de la culture et les préparations récurrentes de milieu de culture. Dans le cas d'un réacteur de gros volume, tel que celui développé pour les écloseries de mollusques, la stérilisation initiale et la préparation et l'injection du milieu de culture sont des postes coûteux en main d'œuvre et représentent des manipulations délicates, répétitives et sources potentielles de contamination.

Le laboratoire PBA a initié le développement d'un automate de « mélangeur en ligne » (Figure 26a) qui répond à cette double préoccupation. Le principe essentiel de ce dispositif est d'opposer une barrière physique constante aux contaminants extérieurs, qui permet d'éviter toute rupture de stérilité au cours des différentes opérations de fonctionnement du photobioréacteur. Etant donnée sa vocation industrielle, le cahier des charges du mélangeur tient compte de la robustesse à un environnement agressif, de la simplicité de mise en œuvre, du coût et de la capacité d'automatisation poussée. Le prototype a été conçu dans le cadre d'une collaboration avec la société Protolabo.

Pour ce qui concerne les solutions de protection mises en place contre les contaminations, la filtration frontale (0,2 μm) a été retenue, dans un premier temps, pour stériliser l'eau de mer. La stérilisation de la solution nutritive de type Conway ne peut cependant pas être réalisée par filtration. Il a donc été choisi de recourir à une stérilisation par autoclavage de la solution stock, et de réaliser la connexion avec le mélangeur en présence d'une flamme, pour réduire autant que possible l'introduction de contaminants dans le système.

Le dosage de la solution nutritive dans l'eau de mer est assuré par un temps d'ouverture d'électrovanne. Cette solution technique devra être éprouvée pour en caractériser la répétabilité et la précision.

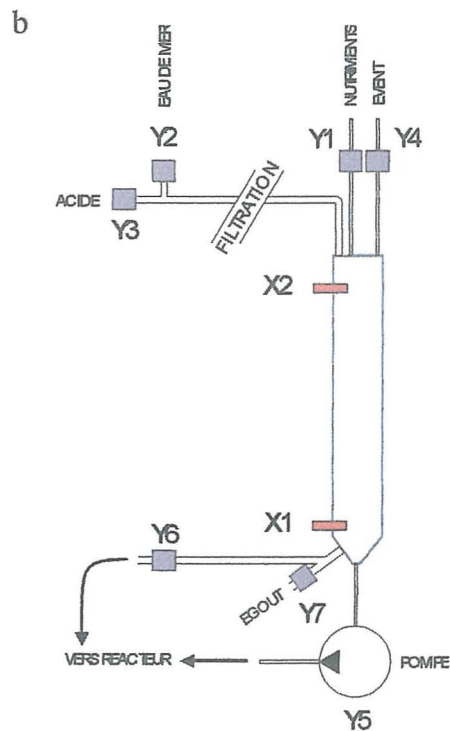
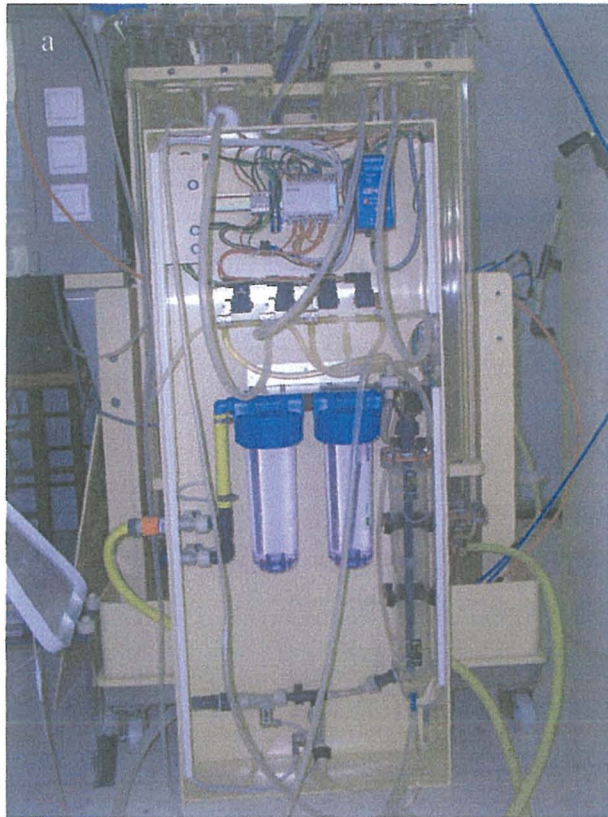


Figure 26 (a) photographie du dispositif de mélangeur en ligne. (b) représentation schématique des composants du dispositif.

La Figure 26b présente le principe général du mélangeur en ligne, piloté par automate. Celui-ci est essentiellement constitué d'une cuve de 3-L, équipée d'une injection d'eau de mer stérile et d'une entrée de solution nutritive stock. Des capteurs de niveaux (X1 et X2) déclenchent automatiquement l'opération de dosage entre la solution nutritive et l'eau de mer. Ce mélange est ensuite distribué classiquement par une pompe doseuse.

Les étapes de fonctionnement générale du mélangeur en ligne peuvent être résumées comme suit :

1-stérilisation initiale

- remplissage acide
- attente 20 min
- vidange acide

2-rinçage eau de mer

- remplissage eau de mer
- vidange eau de mer

3-remplissage eau de mer enrichie

- injection nutriments
- remplissage eau de mer

4-attente ordre de démarrage (une fois la culture inoculée)

5- préparation en ligne de milieu

état initial : mélangeur niveau inférieur

injection dose nutriments

injection et mélange statique de l'eau de mer

6-distribution de l'eau de mer enrichie en continu

Une fois l'étape 5 déclenchée, celle-ci se déroule automatiquement, dès que le niveau inférieur du mélangeur est atteint ; ainsi, une faible quantité de milieu est préparée régulièrement, garantissant sa composition chimique dans le temps. En cas de contamination accidentelle, cette solution représente un frein au développement des contaminants en amont de la culture.

Au cours de l'année 2006, les travaux ont consisté à définir l'enchaînement des différentes étapes de fonctionnement, et à réaliser le prototype. Ces travaux seront complétés, au cours de l'année 2007, par une campagne d'essais et de mise au point.

4.2.2. Automatisation de la distribution des microalgues

Au cours d'un élevage larvaire, la demande en microalgues, par larve, augmente de manière importante. Pour répondre précisément à cette caractéristique, il est souhaitable d'associer la production en continu de microalgues à un dispositif de distribution automatique aux élevages.

Grâce à un capteur de biomasse algale, présent dans le bac d'élevage, il est possible de déterminer la biomasse présente et d'asservir une pompe de distribution. Le laboratoire PBA développe un capteur d'atténuation optique (étude de brevet en cours), spécifiquement adapté à la mesure de biomasse algale, dont les caractéristiques sont parfaitement adaptées à ce type d'utilisation.

Le capteur est équipé de trois DEL de longueurs d'onde différentes (470, 660 et 800 nm), ce qui permet de cibler le suivi d'une biomasse particulière. Au cours de cette année, les travaux ont essentiellement concerné la caractérisation de la réponse du capteur (linéarité, sensibilité, précision et répétabilité). Un exemple d'étalonnage du capteur sur la concentration cellulaire de *Isochrysis affinis galbana* clone Tahiti est présenté sur la Figure 27.

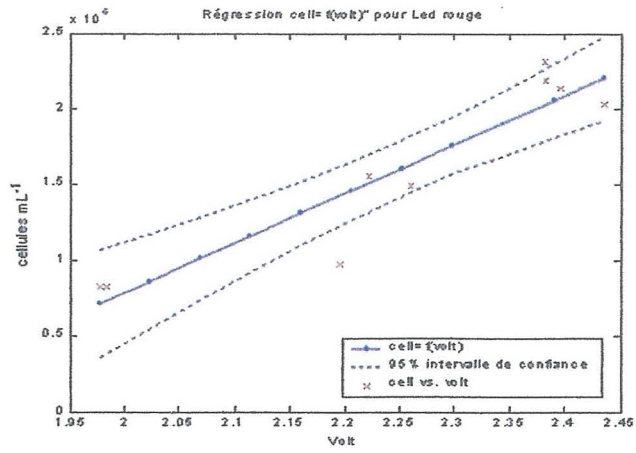


Figure 27 exemple de courbe d'étalonnage du capteur d'atténuation sur la concentration cellulaire de *Isochrysis affinis galbana* clone Tahiti, obtenu pour la longueur d'onde 660 nm.

5. Conclusion

Les travaux conduits au cours de l'année 2006 ont permis des avancées significatives sur le plan biologique - avec une meilleure compréhension de la culture en continu de *Chaetoceros gracilis* et des essais de nutrition des mollusques sur la base d'algues produites en continu – et sur le plan technologique, avec la continuité du développement du photobioréacteur d'écloseries commerciales et la mise au point du mélangeur en ligne pour l'approvisionnement du photobioréacteur en milieu de culture.

Suite aux instabilités constatées au cours de l'année 2005, sur les cultures en continues de *Chaetoceros sp.*, les études écophysiologicals conduites sur *Chaetoceros gracilis* ont abouti à la mise au point d'un protocole de culture en irradiance limitante, qui assure des équilibres stables dans le temps. Ces travaux ont mis en évidence qu'une limitation minérale du taux de croissance par l'azote pouvait être reliée aux difficultés de culture observées précédemment.

Les essais d'élevages larvaires sur la base des cultures en continu de microalgues ont permis de mettre en évidence l'intérêt de l'élevage en flux ouvert ainsi que de l'association entre flux ouvert et cultures d'algues en continu. Cette technique conduit globalement à des performances identiques aux protocoles classiques (cultures d'algues en batch et élevages fermés). Les élevages conduits en circuit fermé ont cependant montré des performances généralement plus faibles lorsque les algues étaient produites en culture en continu. Ces moindres performances doivent être reliées à une mauvaise qualité des cultures en continu, sans doute due au manque de contrôle de la qualité du milieu injecté. Ces résultats soulignent l'intérêt de développer des périphériques de culture de microalgues assurant la maîtrise de la qualité des apports de milieu dans un photobioréacteur.

Les études portant sur le développement du photobioréacteur d'écloseries commerciales ont permis de déterminer les caractéristiques de transferts de gaz de la géométrie proposée. Les résultats indiquent que les capacités d'échange gazeux excèdent largement la production d'oxygène liée à la photosynthèse de la biomasse microalgale. En conséquence, les transferts d'oxygène ne seront pas un facteur limitant de la productivité du photobioréacteur. Les performances de culture de t-Iso sur la configuration hydrodynamique proposée, ont été comparées à celles obtenues sur une configuration classique ; les résultats démontrent des performances équivalentes, mais révèlent un dépôt de biofilm retardé dans le cas de la configuration hydrodynamique développée. Cette caractéristique contribuera à maintenir les cultures en continu sur des périodes longues, ce qui est déterminant lorsque l'on considère l'économie du système.

Le développement des périphériques de culture des microalgues a abouti à la fabrication d'un prototype de mélangeur en ligne de milieu nutritif et à la définition du détail de ses étapes de fonctionnement. Les tests de ce nouveau matériel devront valider l'autonomie du système pour effectuer la stérilisation initiale du photobioréacteur et la préparation en ligne du milieu de culture. Cette seconde étape sera conduite au cours de l'année 2007.

Bibliographie

Aubry, B., 2006. Rapport de stage 1^{ère} année Master Génie des Procédés de l'Université de Nantes: Etude des transferts de gaz dans un photobioréacteur. *Ifremer*, Nantes. pp. 41

Bougaran G., Le Déan L., Lukomska E., Kaas R., Baron B., 2003. Transient initial phase in continuous culture of *Isochrysis galbana affinis Tahiti*. *Aquatic Living Resources*, 16(4), 289-394.

Drebes, G., 1977. Sexuality. In *The Biology of Diatoms* (D. Werner, ed.), Uni. California Press, Berkeley; p.250-283.

Lewis, W. M. , 1984. The diatom sex clock and its evolutionary significance. *Amer. Naturalist* 123:73-80.

Oku O. and Kamatini A., 1995. Resting spore formation and phosphorus composition of *Chaetoceros pseudocurvisetus* under various nutrient conditions. *Mar Biol*, 123, 393-399.

Oku O. and Kamatini A., 1997. Resting spore formation of the marine planktonic diatom *Chaetoceros anastomosans* induced by high salinity and nitrogen depletion. *Mar Biol*, 127, 510-515.

Ponis, E., Probert, I., Veron, B., Le Coz, J. R., Mathieu, M. and Robert, R., 2006. Nutritional value of six Pavlovophyceae for *Crassostrea gigas* and *Pecten maximus* larvae. *Aquaculture*, 254 (1-4), 544-553.

Ricard, 1987 Michel. Atlas du phytoplancton marin : Diatomophycées VolIII. Editions du centre National de la recherche scientifique.

Rico-Villa, B., Le Coz J.R., Mingant C. and Robert R., 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg), *Aquaculture*, 256 (1-4), 377-388.

Robert R., Chrétiennot-Dinet M.J., Kaas R., Martin-Jézéquel V., Moal J., Le Coz J.R., Nicolas J.L., Bernard E., Connan J.P., Le Déan L., Gourrierc G., Leroy B., Quéré C., 2004. Amélioration des productions phytoplanctoniques en éclosérie de mollusques : caractérisation des microalgues fourrage, RI DRV/RA-2004-05, 149 p.

Roustan, M., 2003. Transferts gaz-liquide dans les procédés de traitement des eaux et des effluents gazeux. INSA ISBN 2-7430-0605-6. pp.

Valenzuela-Espinoza, Millán-Núñez R., Núñez -Cebrero 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, *Aquacultural Engineering*, 20, 135-147.

Von'stosch H. A., Theil G., and Kowallik K., 1973. Entwicklungsgeschichtliche untersuchungen an zentrischen diatomeen, V Bau und lebenszyklus von *Chaetoceros didymum*, mit beobachtungen uber einige andere arten der gattung, *Helgol. Wiss. Meeresunters.*, 25, 384,

Wu, W. T., Wu, J. Y. and Jong, J. Z., 1992. Mass transfer in an airlift reactor with a net draft tube. *Biotechnology Progress*, 8 (5). 465-468.

Zittelli, G. C., Rodolfi, L., Biondi, N. and Tredici, M. R., 2006. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*, 261 (3), 932-943.
