

# TRAITEMENT D'EFFLUENTS CONCHYLICOLES PAR ULTRAFILTRATION

Clémence CORDIER<sup>1</sup>, Christophe STAVRAKAKIS<sup>2</sup>, Béatrice DUPUY<sup>2</sup>, Mathias PAPIN<sup>2</sup>,  
Patrick SAUVADE<sup>3</sup>, Franz COELHO<sup>3</sup>, Philippe MOULIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Aix Marseille Université, Laboratoire de Mécanique, Modélisation et Procédés Propres (M2P2-CNRS-UMR 7340), Europôle de l'Arbois, BP 80, Bat. Laennec, Hall C, 13545 Aix-en-Provence cedex 04

<sup>2</sup> Laboratoire Sécurisation des Productions en Conchyliculture, Station Ifremer de Bouin, Polder des Champs, 85230 Bouin

<sup>3</sup> Suez - Aquasource, 20, avenue Didier Daurat, 31029 Toulouse cedex 04

## INTRODUCTION

En aquaculture, la gestion de l'eau entrante et des effluents requiert l'utilisation de procédés de traitement et de désinfection en milieu salin. C'est particulièrement le cas dans un contexte actuel de crise sanitaire affectant les animaux. La conchyliculture notamment, doit faire face à deux enjeux : la dégradation des eaux côtières, par la présence de pathogènes responsables de mortalités sur les huîtres juvéniles et adultes, mais aussi la préservation de l'environnement face à la production d'huîtres exotiques. Dans cette étude, l'objectif est de traiter les effluents d'écloseries conchylicoles dans le cas de la production d'huîtres dites de quatre saisons. Contrairement aux huîtres naturelles diploïdes, ces huîtres triploïdes sont stériles. Cette particularité leur confère deux avantages : leur croissance est plus rapide que les huîtres naturelles et leur qualité gustative reste constante tout au long de l'année puisqu'elles n'entrent pas en gamétogénèse [1]. Pour les produire, une des techniques consiste à croiser des huîtres tétraploïdes avec des huîtres diploïdes [2]. C'est la production de ces coquillages tétraploïdes qui engage un risque pour la biodiversité marine. En effet, si du matériel biologique était relâché dans l'environnement, le danger pourrait être la stérilisation des huîtres présentes naturellement dans le milieu. L'élimination des gamètes et larves des effluents des établissements conchylicoles susceptibles de les produire est donc essentiel et la biosécurité des fermes qui produisent ce type de coquillages : c'est une priorité pour les professionnels qui vont devoir faire avec de nouvelles réglementations environnementales.

Si de précédentes études ont mis en avant l'impact du chlore sur les larves d'huîtres creuses [3] et des rayonnements UV sur les spermatozoïdes de ces coquillages [4], très peu de travaux ont été menés sur le traitement de l'effluent considéré. L'Ifremer a néanmoins étudié et validé les procédés d'oxydation par le chlore et l'ozone ainsi que les rayonnements UV pour le traitement du matériel biologique d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* [5]. Si l'efficacité de la désinfection chimique a été démontrée, cette technique a l'inconvénient de pouvoir engendrer une pollution supplémentaire par la création de sous-produits de désinfection [6–8]. En effet les espèces oxydantes réagissent en créant des sous espèces réactives potentiellement néfastes pour les élevages concernés par ces traitements [9] mais aussi pour l'environnement aquatique. Les rayonnements UV sont donc considérés comme une alternative efficace à l'ozonation et la chloration pour l'inactivation de pathogènes dans les élevages aquacoles [10,11] puisqu'ils ne génèrent pas de sous-produits. Nonobstant, l'efficacité de traitement par ce procédé est liée à la transmittance et la turbidité de l'eau [12,13]. D'une manière générale, il n'existe pas de traitement universel des effluents, et plus particulièrement en conchyliculture, les deux procédés proposés génèrent soit un transfert d'impact, soit voient leur efficacité diminuer du fait de la qualité de l'eau à traiter.

Les procédés membranaires semblent pouvoir apporter une réponse appropriée à cette problématique. En aquaculture, s'ils font partie des procédés moins conventionnels,

plusieurs études ont mis en avant leur efficacité pour répondre aux réglementations en traitement des eaux entrantes. Par exemple, la nanofiltration s'est montrée efficace pour la rétention de contaminants comme le fer total, le phosphore total et la DBO, pour atteindre les limites requises [14]. En eau de mer, Castaing *et al.* ont obtenu une élimination totale de micro algues toxiques en utilisant des membranes immergées de microfiltration [15]. Pour le traitement des effluents, les procédés membranaires ont été testés dans le cas de systèmes de recirculation en eau douce ou salée pour la rétention de particules fines et de biomasse dans les effluents. Ainsi, les performances de la microfiltration [16], de l'ultrafiltration [17], de la nanofiltration [18] et de l'osmose inverse [19] ont été validées en termes de rétention mais aussi de production.

L'objectif est donc d'étudier la filtration membranaire pour le traitement des effluents biologiques en sortie de fermes conchylicoles. L'efficacité de l'ultrafiltration membranaire pour la rétention de spermatozoïdes et d'ovocytes d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* a été évaluée dans le cas de pollutions chroniques ou accidentelles, susceptibles d'être retrouvées en conditions réelles d'écloserie, et la viabilité de ces espèces a été étudiée après traitement par cytométrie en flux et analyse microscopique.

Le pilote d'ultrafiltration utilisé pour les essais, de taille semi industrielle, est complètement automatisé. Une des particularités de cette installation de traitement est la méthode de nettoyage des membranes mise en place pour éliminer le colmatage, principale limite des procédés membranaires. En effet, en plus des procédures classiques de rétrolavages et nettoyages chimiques, l'unité de filtration procède à des rétrolavages dits essorés qui consistent en deux étapes à un essorage des membranes par injection d'air comprimé suivi d'un rétrolavage. Si des études ont montré que l'injection d'air pendant les rétrolavages étaient une méthode efficace pour contrôler l'accumulation de matière à la surface des membranes [20–25], le présent travail a aussi eu pour objectif d'évaluer l'efficacité du nettoyage des membranes par cette procédure en deux étapes dans le cas de filtration d'eau de mer et d'effluents contenant du matériel biologique.

## I. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

### I.1. Eau de mer et effluents de gamètes

Les essais ont été réalisés à la station Ifremer de Bouin (France) ayant accès à une eau de mer naturelle (océan Atlantique) en continu depuis la baie de Bourgneuf. Sur les 7 mois d'essais, la qualité de l'eau de mer entrante a été caractérisée par les paramètres présentés Tableau I. Les mesures de chlorophylle et de phéo-pigments donnent une information sur la biomasse.

Tableau I : Caractéristiques de l'eau de mer avant pré-traitements

	Min.	Max.	Moyenne
Turbidité (NFU)	0,674	13,4	4,5
Salinité (%)	30,8	34,7	33,5
Chlorophylle a ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	0,89	7,04	2,5
Phéo-pigments ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	0,24	1,84	0,71

L'eau de mer utilisée pour les essais subit une série de prétraitements : décantation par passage dans des claires, filtration sur sable (25-30  $\mu\text{m}$ ) et traitement par rayonnements UV. Seule la turbidité est alors mesurée à l'entrée du pilote de filtration (valeur inférieure à 10 NTU).

Les écloséries de coquillages peuvent être confrontées à (i) des pollutions chroniques correspondant à une libération continue de petites quantités de gamètes et (ii) des pollutions accidentelles correspondant à un rejet d'une grande quantité de gamètes sur

une durée courte. Cette dernière pollution peut avoir pour origine un relargage spontané de tous les individus du même élevage ou le rejet d'un surplus de gamètes dans les effluents pendant la fécondation. Pour simuler ces pollutions, deux types d'effluents ont été préparés avec des concentrations en gamètes proches de celles retrouvées dans des conditions réelles de production de naissain d'huîtres. Dans le cas des essais simulant une pollution chronique, la filtration des solutions de spermatozoïdes ou d'ovocytes a été suivie pendant plus de 30 h avec des concentrations dans les effluents de l'ordre de 10 000 spz.mL<sup>-1</sup> ou 69 ovo.mL<sup>-1</sup> respectivement. Pour les pollutions accidentelles, les effluents sont traités pendant 5 h avec des concentrations en entrée de membrane de l'ordre de 200 000 spz.mL<sup>-1</sup> ou de 300 ovo.mL<sup>-1</sup>. Afin d'obtenir ces effluents, des solutions hautement concentrées de spermatozoïdes ou d'ovocytes alimentent le bac tampon du pilote de filtration. Celles-ci sont préparées à partir d'huîtres creuses à maturité sexuelle, appelées « géniteurs », élevées sur la plate-forme expérimentale Ifremer de Bouin dans des conditions de températures et d'alimentations favorables à la gamétogenèse. Le sexe des coquillages est déterminé par l'analyse d'un échantillon de gonades au microscope et les gamètes sont récupérés par scarification de la gonade.

## I.2. Membranes, pilote de filtration et conditions opératoires

Des membranes fibres creuses multicanaux Aquasource ont été utilisées pour tous les tests. Le seuil de coupure de ces membranes d'ultrafiltration (UF) en polyéthersulfone était de 200 kDa, et la perméabilité initiale était de 1000 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>.bar<sup>-1</sup>. Chaque fibre creuse était constituée de 7 canaux de 0,9 mm de diamètre interne, pour une surface totale du module UF de 8 m<sup>2</sup>. Le module membranaire a été intégré dans un pilote semi-industriel, Figure 1 [26], capable de traiter 20 m<sup>3</sup>.j<sup>-1</sup>. L'installation était entièrement automatisée et les paramètres de filtration capables de s'adapter à la qualité de l'eau à traiter. Pour contrôler les performances de filtration, des capteurs de pression et de température et des débitmètres, ont été connectés à un enregistreur de données et tout cet ensemble est contrôlé par un automate. Un réservoir (100 L) est alimenté en continu avec de l'eau de mer prétraitée. Dans les tests de gamètes, en cas de pollution chronique, une pompe doseuse injectait une solution concentrée dans le réservoir d'alimentation avec un débit fonction du flux de production afin de maintenir constante la concentration de gamètes à l'entrée du module. En cas de pollution accidentelle, les gamètes étaient injectés en une fois dans le bac d'alimentation. Avant d'entrer dans le module, l'effluent est classiquement préfiltré pour retenir les particules supérieures à 130 microns. Les tests ont tous été réalisés en filtration frontale et le perméat était récupéré dans un bac tampon (100 L) pour être utilisé pour le nettoyage des membranes.

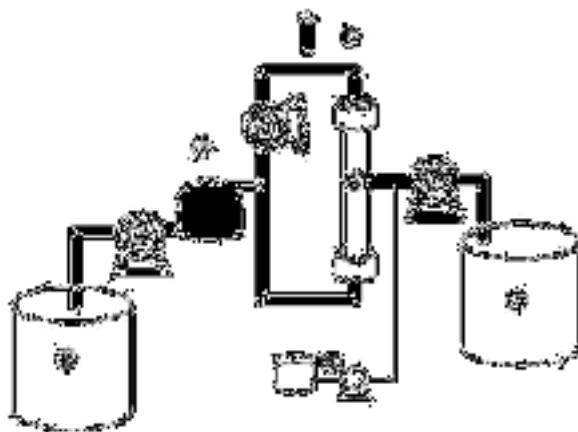


Figure 1 : Pilote (1, bac d'alimentation ; 2, pompe d'alimentation ; 3, préfiltre ; 4, pompe de recirculation ; 5, module membranaire ; 6, pompe de rétrolavage ; 7, bac tampon de perméat pour rétrolavages ; 8, postes de chimie pour CEB ; 9, purge)

Pour éliminer le colmatage des membranes, plusieurs types de nettoyages étaient effectués automatiquement par le pilote : des rétrolavages classiques (CB), des rétrolavages essorés (AB) qui consistaient en une première étape de drainage de la membrane par injection d'air comprimé avant rétrolavage, et des nettoyages chimiques (CEB). Le préfiltre est lavé à chaque CB ou AB. Environ 15 L de perméat sont utilisés pour cette opération.

La perméabilité ( $L_p$ ) et la pression transmembranaire (PTM) sont calculées en continu toutes les min. Tous les résultats sont exprimés à 20°C en prenant en compte la variation de température sur la viscosité de l'eau. Les conditions de filtration pour l'eau de mer, flux de perméat et temps de filtration, ont été présélectionnées selon la littérature [27] et celles imposées pour la filtration des gamètes ont été choisies en s'appuyant sur les résultats de filtration de l'eau de mer afin d'avoir à la fois un taux de production élevé et un colmatage limité.

### **I.3. Méthodes analytiques**

La cytométrie en flux permet une analyse quantitative et qualitative des gamètes. Elle est basée sur la fluorescence naturelle des cellules ou par l'ajout d'un marqueur. Les caractéristiques des cellules telles que la taille et la forme sont détectées par le défilement des particules devant un laser et peuvent être classées selon ces caractéristiques. Dans le cas des gamètes, des méthodes ont été développées pour mettre en évidence, en fonction de la taille et de la forme des cellules analysées, une zone correspondant aux ovocytes ou spermatozoïdes [28,29]. Afin d'en déterminer la concentration, les solutions de gamètes ont été analysées par un cytomètre de flux Partec. Deux échantillons de 800  $\mu$ L ont été analysés et une reproductibilité satisfaisante a été obtenue pour les différentes solutions. La viabilité des ovocytes a été mesurée en utilisant deux marqueurs de fluorescence : SYBR-Green, qui pénètre dans les cellules vivantes et mortes et IP qui pénètre dans les cellules dont les membranes sont endommagées. 10  $\mu$ L de SYB-Green et 5  $\mu$ L d'IP ont été mélangés à 800  $\mu$ L de l'échantillon d'ovocytes. Cette solution a ensuite été analysée après 10 min dans l'obscurité [29]. La viabilité des spermatozoïdes a été déterminée en utilisant la même méthode mais avec l'utilisation de SYBR-14 au lieu de SYBR-Green. En plus des analyses cytométriques, l'intégrité des ovocytes et des spermatozoïdes a été contrôlée par observation au microscope à contraste de phase relié à une caméra vidéo. Les spermatozoïdes ont été filmés sur cellules de comptage Malassez afin de déterminer la vitesse de déplacement de ces espèces dans l'échantillon (la durée des films était de 5 secondes). Pour les ovocytes, des photos ont été réalisées pour caractériser leur forme et l'état de la membrane cellulaire.

## **II. RESULTATS EXPERIMENTAUX**

### **II.1 Filtration d'eau de mer**

Pendant 7 mois, la filtration d'eau de mer de la baie de Bourgneuf a été réalisée pour différentes conditions de filtration (flux et temps de filtration entre 2 rétrolavages). Les paramètres de filtration ont été enregistrés toutes les min sur la durée des tests pour suivre le comportement des membranes. Le colmatage alors généré était fonction de deux facteurs : les conditions imposées et la qualité de l'eau traitée.

Il est à noter que, même si chaque condition a été testée deux fois de manière aléatoire sur la période d'essai, les résultats obtenus sont directement liés à la qualité de l'eau entrante au moment du test. L'objectif de ces tests de filtration d'eau de mer était de déterminer les conditions à imposer pour les filtrations des effluents de gamètes. Le flux de filtration pour ces tests ne devait pas être trop élevé pour limiter la quantité de matériel biologique à utiliser, mais suffisamment important pour être adaptable aux fermes

aquacoles. De plus, il était nécessaire de prendre en compte l'addition de matériel biologique (gamètes) qui augmente considérablement le colmatage. Quant au temps de filtration, il devait être suffisamment long pour rester cohérent avec l'objectif de productivité du procédé. En effet, l'eau utilisée pour le rétrolavage est de l'eau ultrafiltrée et le volume de concentrat généré lors de ces rétrolavages devient un effluent qui doit être traité, l'objectif était donc aussi de limiter ce volume. Les conditions opératoires ainsi testées étaient respectivement pour le flux de filtration et le temps de filtration de 60 à 100  $L.h^{-1}.m^{-2}$  et 20 à 45 min. Pour répondre aux contraintes précisées ci-dessus, un flux de 60  $L.h^{-1}.m^{-2}$  et des temps de filtration de 30 min et 60 min ont alors été sélectionnés. Le suivi de la perméabilité obtenu dans ces conditions est présenté Figure 2.

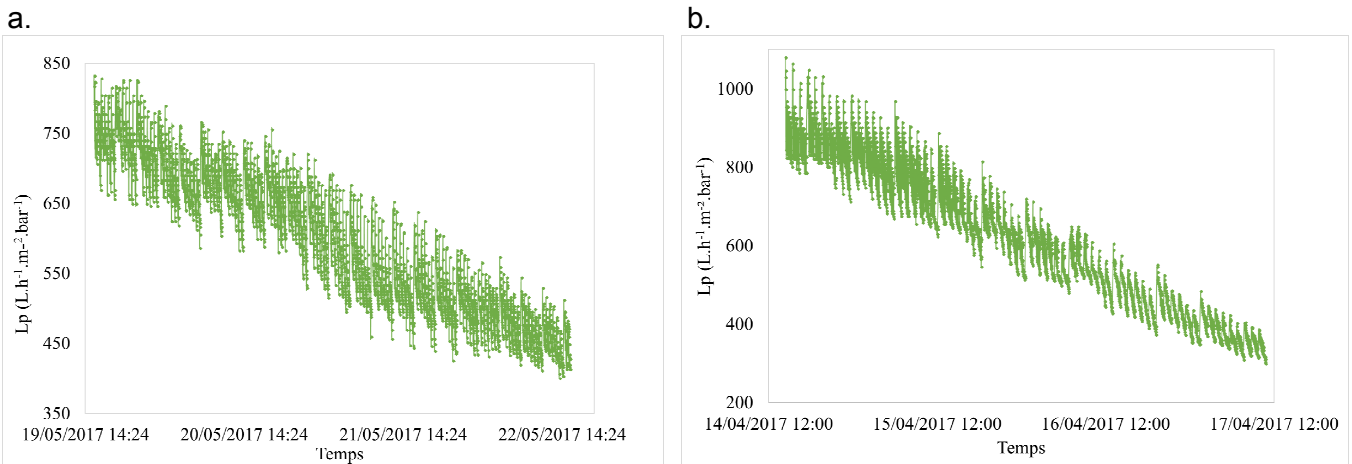


Figure 2 : Evolution de la perméabilité en fonction du temps a. [ $J = 60 L.h^{-1}.m^{-2}$  ;  $t_{filtration} = 30 min$ ] et b. [ $J = 60 L.h^{-1}.m^{-2}$  ;  $t_{filtration} = 60 min$ ]

Pour éliminer le colmatage, l'efficacité des RLess peut être observée en suivant l'évolution de la perméabilité sur un zoom de 6 cycles de rétrolavage (Figure 3a). L'injection d'air améliore en effet le nettoyage de la membrane puisque la hausse de la perméabilité initiale est plus élevée après RLess qu'après le RL du cycle précédent. Ce résultat est confirmé quel que soit le couple ( $J-t_{filtration}$ ) de conditions fixées. Afin d'estimer le gain obtenu par l'injection d'air sur le nettoyage des membranes, le bénéfice sur la PTM après rétrolavage a été évalué. Les résultats obtenus après un RLess ont été comparés à la moyenne des résultats générés par les 5 RL précédents. La figure 3b. présente ces résultats pour différentes conditions de fonctionnement.

Au fur et à mesure que le colmatage augmente, généré par une augmentation de la force motrice (flux de perméat) et/ou du temps de filtration, le gain de PTM augmente avec ou sans injection d'air. Cependant, quelles que soient les conditions de filtration testées, l'injection d'air augmente l'efficacité du rétrolavage. Pour la même force motrice de 60  $L.h^{-1}.m^{-2}$  et pour différents temps de filtration de 20 à 60 min, la régénération de la membrane est améliorée de 16% à 39% grâce à l'injection d'air. Plus le temps de filtration est long, plus l'amélioration est significative. Des résultats similaires ont été obtenus pour une durée constante et un flux de perméat différent. Ces résultats mènent à la conclusion que l'efficacité des RLess est significative pour le nettoyage des membranes utilisées pour la filtration d'eau de mer.

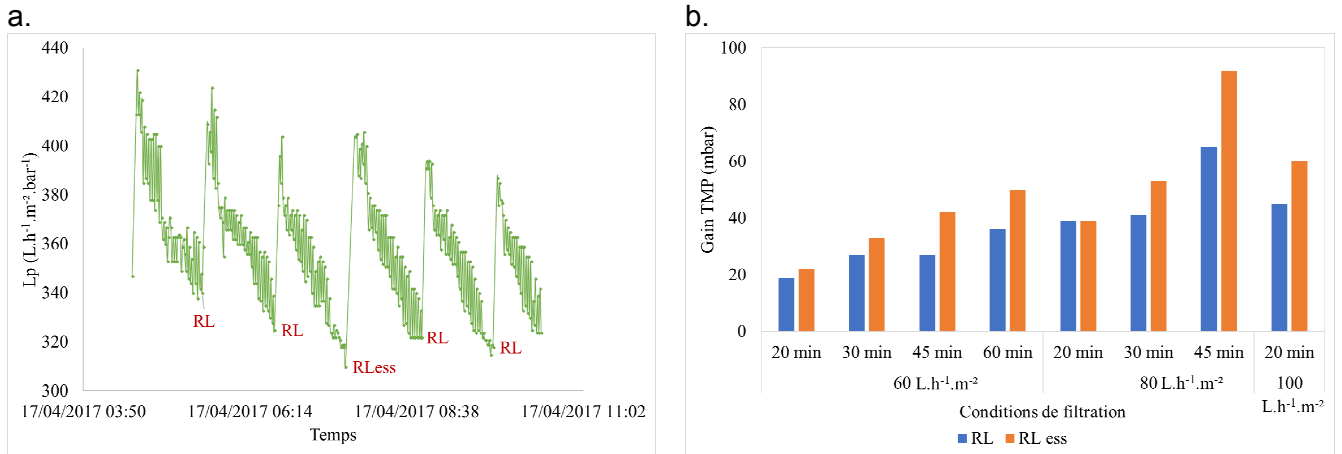


Figure 3 : Filtration d'eau de mer a. Evolution de la perméabilité en fonction du temps [ $J = 60 \text{ L.h}^{-1} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{bar}^{-1}$  ;  $t_{\text{filtration}} = 60 \text{ min}$ ] – Zoom sur une période de 7h et b. Gain de PTM après RL et RLess pour différentes conditions

Dans le cadre de l'étude, il est nécessaire de valider la robustesse du procédé d'ultrafiltration face aux différents effluents traités. Le suivi de la perméabilité sur l'ensemble de la période doit mettre en avant une régénération satisfaisante des membranes. Ainsi, celle-ci est restée constante pendant les 7 mois d'étude face à la variabilité saisonnière de l'eau de mer, les expériences de filtration d'eau de mer, la filtration des effluents de gamètes (pollutions chronique ou accidentelle) et le cas extrême et accidentel d'une contamination de l'eau de mer (Figure 4). Cet accident de qualité d'eau, ayant pour origine un dysfonctionnement des prétraitements de l'eau, se traduit par une baisse de la perméabilité d'un facteur 10 par rapport à la perméabilité initiale. Suite à ces différents événements, chaque CEB réalisé a permis de retrouver une perméabilité autour de  $700 \text{ L.h}^{-1} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{bar}^{-1}$  (Figure 4). La robustesse du processus d'ultrafiltration est ainsi démontrée.

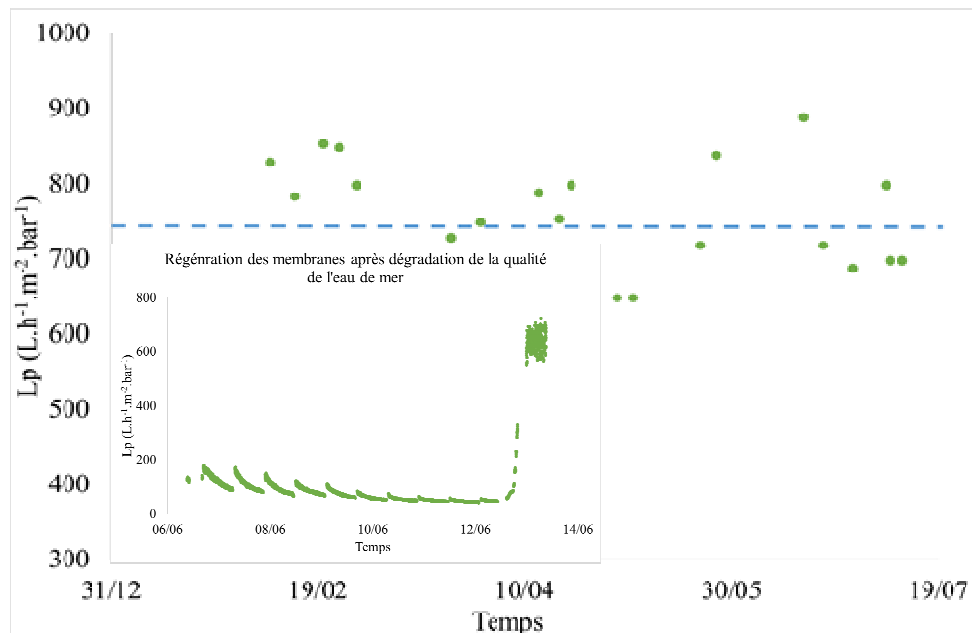


Figure 4 : Régénération des membranes sur la période d'essai et après la dégradation accidentelle et ponctuelle de la qualité d'eau traitée

## II.2 Traitement des effluents d'eau de mer contenant des spermatozoïdes

L'objectif de ces essais de traitement est double : (i) la rétention des gamètes par le procédé doit être totale pour les différentes conditions de filtration et concentrations de gamètes dans l'effluent et (ii) le colmatage causé par ce matériel biologique doit être maîtrisé dans le temps.

### II.2.1 Pollution chronique

Le but de ces essais de filtration chronique est d'évaluer les performances de l'ultrafiltration vis-à-vis d'un effluent d'écloserie conchylicole peu chargé en gamètes mais sur une longue durée. Deux conditions de filtration ont été testées : un flux à  $60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  et deux temps de filtration, 30 et 60 min, pour des périodes d'expérimentation de moins de 3 jours.

Le suivi des performances de filtration sur les 30 h d'essai avec un temps de filtration de 60 min est présenté Figure 5a. Afin de visualiser le colmatage généré par les spermatozoïdes, l'évolution de la perméabilité a été comparée à celle obtenue lors de la filtration d'eau de mer seule dans les mêmes conditions (Figure 5b). Quelles que soient les conditions opératoires imposées, si la diminution de la perméabilité est sensiblement plus forte pour l'eau de mer avec spermatozoïdes, le colmatage généré reste modéré. La baisse de perméabilité observée sur les 30 h d'essai est en effet de l'ordre de  $250 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$  pour les deux tests : l'impact du temps de filtration sur les performances de filtration est donc limité dans nos conditions de traitement.

L'autre conclusion qui ressort de ces essais est l'impact des rétrolavages essorés sur le contrôle du colmatage. L'évolution de la perméabilité sur ces essais mettent en évidence l'impact des rétrolavages essorés sur la récupération des performances de filtration puisque le gain de perméabilité après RL<sub>ess</sub> est supérieur à celui obtenu par le RL classique précédent.

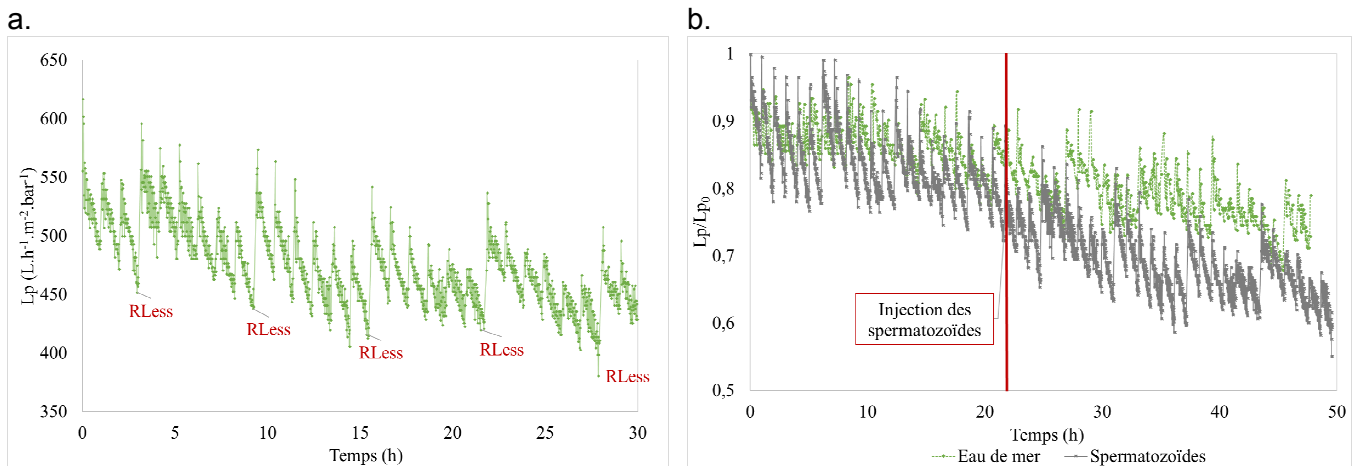


Figure 5 : a. Evolution de la perméabilité en fonction du temps – Traitement d'une pollution chronique de spermatozoïdes b. Comparaison avec la filtration d'eau de mer sans spermatozoïde - [ $J = 60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  ;  $t_{\text{filtration}} = 60 \text{ min}$ ]

Les concentrations aux différents points du système (entrée de membrane, eaux de rétrolavage et rétrolavage essoré et perméat) ont été suivies par cytométrie en flux sur les 30 h d'essai (Figures 6a. et b.). Les cytogrammes obtenus pour la filtration de l'effluent dans les conditions  $J = 60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  et  $t_{\text{filtration}} = 60 \text{ min}$  sont présentés Tableau II. Les concentrations en spermatozoïdes mesurées à l'entrée de la membrane sont en accord avec la valeur attendue de  $10\,000 \text{ spz.mL}^{-1}$ . Cependant, cette concentration fluctue

légèrement au cours du temps et entre les différentes expériences. Les solutions de gamètes sont préparées en introduisant les ovocytes ou les spermatozoïdes de plusieurs géniteurs dans de petits volumes d'eau de mer (environ 1 L) et sont donc très concentrées. La dilution de ces solutions dans le bac d'alimentation du pilote (100 L) ainsi que la difficulté à maintenir une concentration constante dans ce réservoir qui alimente la membrane UF peut expliquer cette variation. La concentration moyenne à l'entrée de la membrane est de  $25,399 \text{ spz.mL}^{-1}$  (valeurs minimales et maximales respectives de  $11,360$  et  $41,675 \text{ spz.mL}^{-1}$ ) pour le test avec une durée de filtration de 30 min et  $7,000 \text{ spz.mL}^{-1}$  pour un temps de filtration de 60 min (valeurs minimales et maximales respectives de  $1\ 305$  et  $19\ 318 \text{ spz.mL}^{-1}$ ).

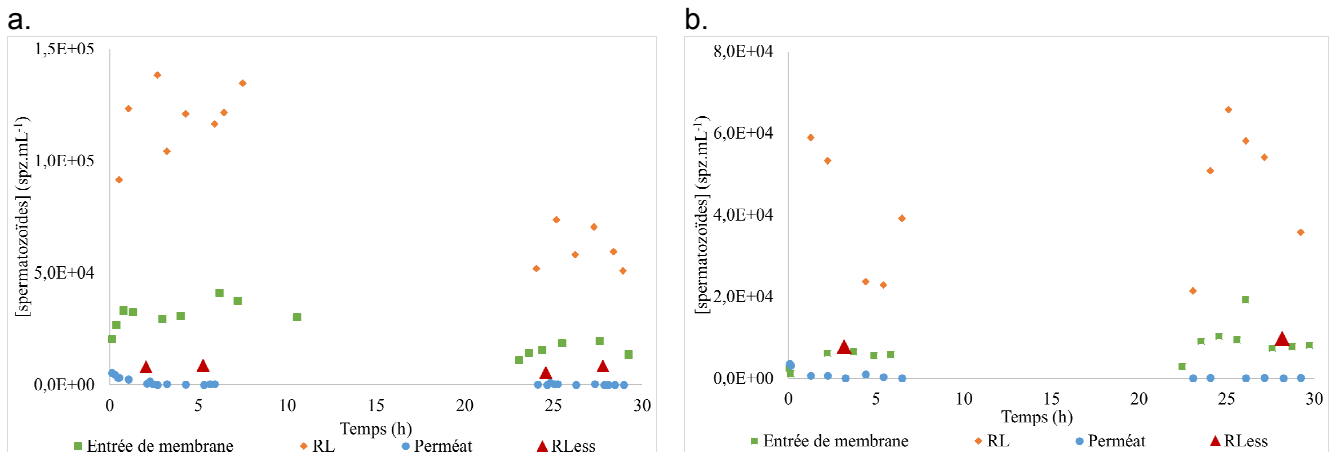


Figure 6 : Evolution de la concentration de spermatozoïdes en fonction du temps – Pollution chronique - a.  $[J = 60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^2 ; t_{\text{filtration}} = 30 \text{ min}]$  et b.  $[J = 60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^2 ; t_{\text{filtration}} = 60 \text{ min}]$

Tableau II : Analyses par cytométrie en flux sur un cycle de filtration de l'effluent de spermatozoïdes –  $[J = 60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^2 ; t_{\text{filtration}} = 60 \text{ min} ; \text{Pollution chronique}]$

	Entrée de membrane	Rétrolavage	Rétrolavage essoré	Perméat
Jour 1	5 115 $\text{spz.mL}^{-1}$	22 485 $\text{spz.mL}^{-1}$	8 100 $\text{spz.mL}^{-1}$	295 $\text{spz.mL}^{-1}$
Jour 2	6 770 $\text{spz.mL}^{-1}$	53 850 $\text{spz.mL}^{-1}$	10 340 $\text{spz.mL}^{-1}$	335 $\text{spz.mL}^{-1}$

Au cours de ces tests, on peut constater que la concentration en spermatozoïdes obtenue dans le perméat est toujours inférieure au seuil de détectabilité de l'analyse par cytométrie en flux ( $350 \text{ spz.mL}^{-1}$ ). A partir du facteur de concentration dans la membrane pendant le cycle de filtration, il est possible de calculer l'abattement en spermatozoïdes obtenu. Pour l'expérience avec la concentration la plus élevée, celui-ci varie en moyenne



entre 3 et 4 log entre le début et la fin du cycle de filtration. Ces réductions sont importantes et témoignent de l'efficacité du traitement. Comme prévu, les concentrations obtenues dans les rétrolavages classiques sont supérieures aux concentrations en entrée de membrane. Cependant le facteur de concentration volumique sur un cycle de filtration n'est pas tout à fait identique au facteur de concentration des spermatozoïdes. Ce résultat, en accord avec l'augmentation de la résistance irréversible avec le temps et s'explique par une efficacité limitée du rétrolavage classique.

Ces eaux de rétrolavage sont des effluents qui doivent être traités, mais l'ultrafiltration présente alors deux avantages. Le premier est immédiat avec la réduction du volume des effluents, ici un facteur de 10 est facilement atteint entre le volume traité et le volume de rétentats récupérés. Le deuxième avantage est l'impact du traitement sur la viabilité des spermatozoïdes. En effet, les films sur les spermatozoïdes montrent que, en moyenne, 18% des spermatozoïdes observés avant la filtration sont en mouvement et que seulement 7% sont mobiles dans les eaux de rétrolavage. La viabilité des spermatozoïdes est donc compromise par cette méthode de traitement. De plus, avec un volume d'eau presque identique à un rétrolavage classique, on s'attend à trouver une concentration beaucoup plus élevée de gamètes dans les eaux de rétrolavages essorés AB. Nonobstant, les concentrations sont beaucoup plus faibles, d'un facteur allant de 1,15 à 7,3 selon les conditions d'exploitation. La cytométrie de flux montre clairement une forte dégradation de l'intégrité des spermatozoïdes et cette observation est confirmée par l'observation au microscope des échantillons d'eau de rétrolavages essorés dans lesquels aucun spermatozoïde en mouvement n'a pu être observé.

## II.2.2 Pollution accidentelle

L'objectif de ces tests était de confirmer les bonnes performances obtenues pour le traitement d'une pollution chronique dans le cas d'une pollution accidentelle. Contrairement aux tests précédents, les gamètes n'étaient pas injectés en continu dans le réservoir d'alimentation du pilote, mais introduits en une seule fois 5 min après chaque rétrolavage. Deux tests dans des conditions de filtration identiques ont été réalisés. La perméabilité, représentée Figure 7, a été suivie au cours des 5 cycles de filtration pour les deux tests.

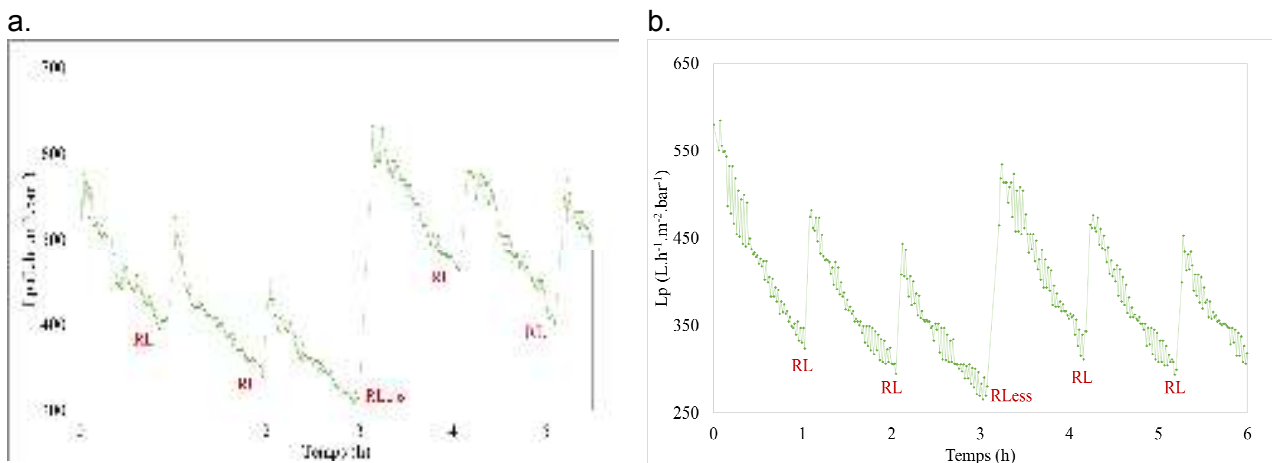


Figure 7 : Evolution de la perméabilité en fonction du temps – Traitement d'une pollution accidentelle de spermatozoïdes [ $J = 60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  ;  $t_{\text{filtration}} = 60 \text{ min}$ ] - a. Test 1 et b. Test 2

Les concentrations en spermatozoïdes, 10 (test 1) et 25 (test 2) fois supérieures que dans le cas de pollution chronique, entraînent un colmatage plus important des membranes. En effet, l'augmentation de l'accumulation de matière à la surface de la membrane entraîne une baisse de perméabilité sur le premier cycle autour de 300 et 350  $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  alors qu'il

était de  $250 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  sur les 30 h pour les tests de traitement de pollution chronique. Si le colmatage est conséquent lors du traitement de cette pollution accidentelle, les Figures 7a et 7b montrent l'efficacité du rétrolavage avec une injection d'air préalable sur le contrôle de cette chute de perméabilité.

L'évolution des concentrations est présentée Figure 8a. et b. et les cytogrammes sur un cycle de filtration, Tableau III. La concentration visée en entrée de membrane, environ 20 fois supérieure à celle imposée pour le test de traitement de pollution chronique, n'est pas constante sur la durée d'un cycle de rétrolavage. Plusieurs mesures sont alors effectuées sur chaque cycle afin de suivre précisément son évolution sur la durée des essais. La différence de concentration entre les deux tests peut s'expliquer par la quantité de spermatozoïdes introduite dans la cuve d'alimentation à chaque injection : celle-ci est plus élevée dans l'essai 2 ( $1,4 \cdot 10^{10}$  spermatozoïdes) que dans l'essai 1 ( $2,91 \cdot 10^{10}$  spermatozoïdes).

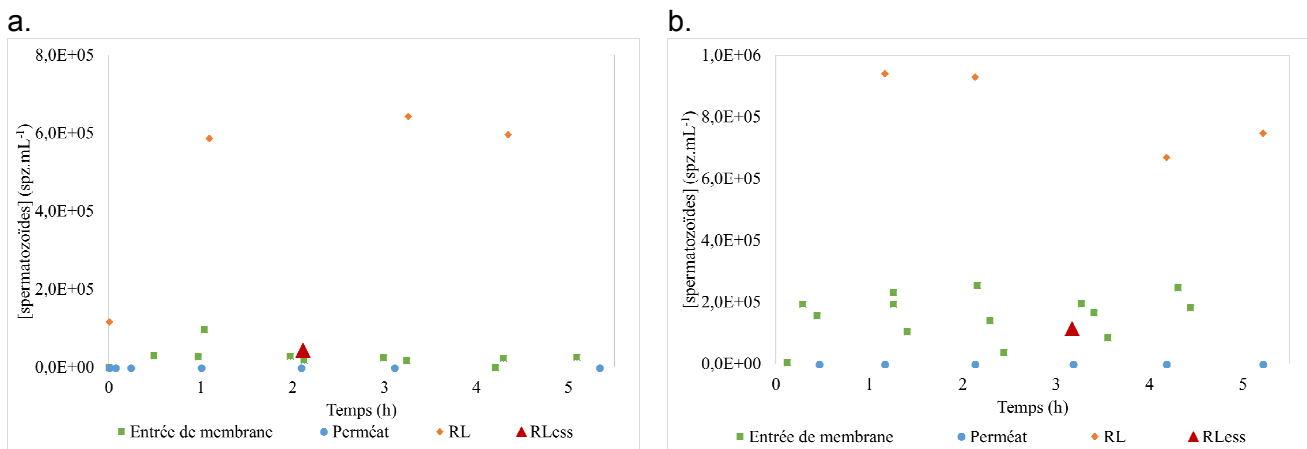


Figure 8 : Evolution de la concentration de spermatozoïdes en fonction du temps [ $J = 60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  ;  $t_{\text{filtration}} = 60 \text{ min}$  ; Pollution accidentelle] - a. Test 1 et b. Test 2

Tableau III : Cytogrammes en flux de spermatozoïdes en fonction du temps [ $J = 60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  ;  $t_{\text{filtration}} = 60 \text{ min}$  ; Pollution accidentelle] pour deux concentrations d'alimentation

	Entrée de membrane	Rétrolavage	Rétrolavage essoré	Perméat
Test 1	29 515 spz.mL <sup>-1</sup>	121 600 spz.mL <sup>-1</sup>	44 175 spz.mL <sup>-1</sup>	275 spz.mL <sup>-1</sup>
Test 2	192 495 spz.mL <sup>-1</sup>	466 715 spz.mL <sup>-1</sup>	11 560 spz.mL <sup>-1</sup>	310 spz.mL <sup>-1</sup>

Quelles que soient les conditions opératoires, les concentrations mesurées dans le perméat sont toujours inférieures à la concentration limite mesurable par cytométrie en

flux. Les abattements calculés sont, comme prévu, plus élevés que pour les tests de pollution chronique et varient entre 4 et plus de 5 log. Ces résultats confirment la rétention des spermatozoïdes d'huîtres creuses par le procédé d'ultrafiltration pour différentes conditions de concentration. Les concentrations dans les eaux de rétrolavage sont plus élevées qu'en entrée de membrane mais sans atteindre le facteur de concentration volumique attendu pour les mêmes raisons que les tests précédents : les spermatozoïdes sont dégradés par l'injection d'air lors des rétrolavages essorés.

La rétention totale des spermatozoïdes dans les différentes conditions testées mais aussi la maîtrise du colmatage par les rétrolavages essorés prouvent les performances de l'ultrafiltration pour le traitement de la pollution accidentelle des spermatozoïdes.

## II.3 Traitement des effluents d'eau de mer contenant des ovocytes

### II.3.1 Pollution chronique

Deux expériences de 30 h ont été réalisées à un flux de  $60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  avec des temps de filtration différents : 30 et 60 min. L'évolution de la perméabilité sur les 30 h pour un temps de filtration de 60 min est présentée Figure 9a. Pour évaluer le colmatage généré par les ovocytes, cette perméabilité est comparée au résultat obtenu lors de la filtration d'eau de mer seule dans les mêmes conditions, Figure 9b. Ces résultats démontrent, comme pour les tests avec les spermatozoïdes, que le colmatage reste modéré lors du traitement de ces effluents, dans les conditions imposées. En effet, pour un temps de filtration de 60 min, la perméabilité diminue de  $200 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  sur les 30 h et pour un temps de filtration de 30 min, les mêmes profils d'évolution de perméabilité sont obtenus avec et sans ovocyte, traduisant un colmatage plus faible.

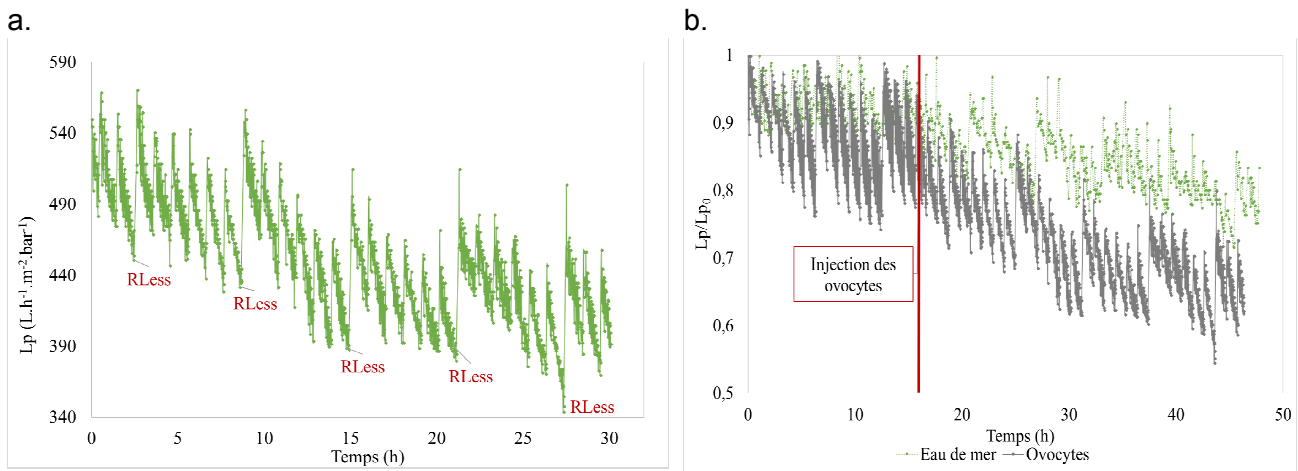


Figure 9 : a. Evolution de la perméabilité en fonction du temps – Traitement d'une pollution chronique de ovocytes et b. Comparaison avec la filtration d'eau de mer sans ovocyte - [ $J = 60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  ;  $t_{\text{filtration}} = 60 \text{ min}$ ]

Les cytogrammes obtenus sur un cycle de filtration dans les conditions  $J = 60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  et  $t_{\text{filtration}} = 60 \text{ min}$  sont présentés Tableau IV et l'évolution des concentrations aux différents points du système pour les deux conditions de filtration, Figure 11. Les concentrations mesurées en entrée de membrane sont proches des concentrations ciblées, comprises entre 10 et 55  $\text{ovo.mL}^{-1}$  avec une moyenne de 28  $\text{ovo.mL}^{-1}$  ( $t_{\text{filtration}} = 30 \text{ min}$ ) et entre 45 et 150  $\text{ovo.mL}^{-1}$  avec une moyenne de 82  $\text{ovo.mL}^{-1}$  ( $t_{\text{filtration}} = 60 \text{ min}$ ).

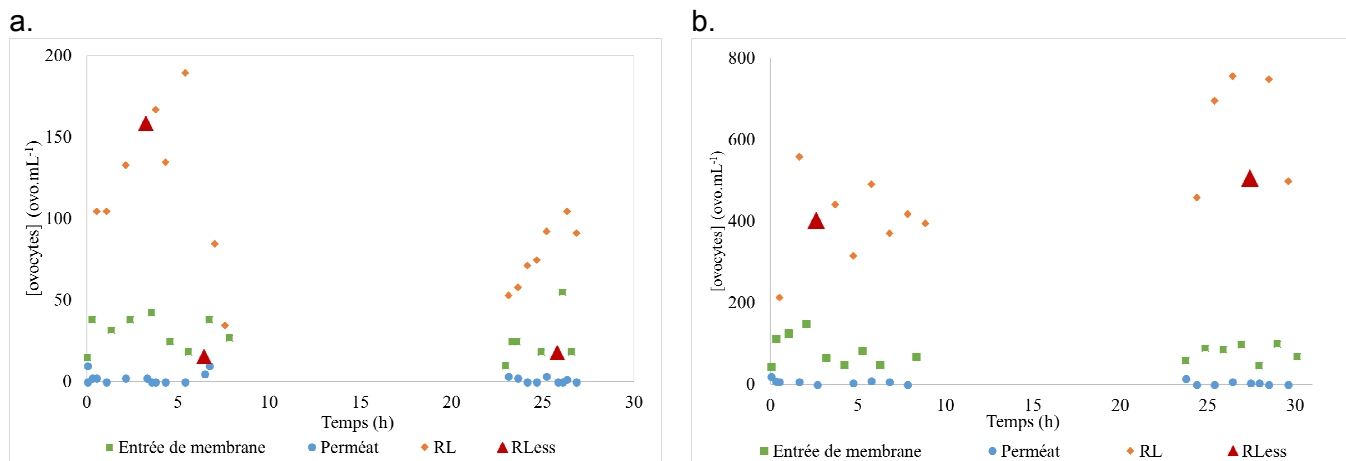


Figure 10 : Evolution de la concentration en ovocytes en fonction du temps – Pollution chronique - a. [ $J = 60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  ;  $t_{\text{filtration}} = 30 \text{ min}$ ] et b. [ $J = 60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  ;  $t_{\text{filtration}} = 60 \text{ min}$ ]

Tableau IV : Résultats d'analyses par cytométrie en flux, concentration et taux d'ovocytes non intègres - [ $J = 60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  ;  $t_{\text{filtration}} = 60 \text{ min}$  ; Pollution chronique]

	Entrée de membrane	Rétrolavage	Rétrolavage essoré	Perméat
Jour 1	55 ovo.mL <sup>-1</sup> 0.0 %	530 ovo.mL <sup>-1</sup> 4.17 %	390 ovo.mL <sup>-1</sup> 5.32 %	0 ovo.mL <sup>-1</sup> -
Jour 2	70 ovo.mL <sup>-1</sup> 5.56 %	750 ovo.mL <sup>-1</sup> 2.86 %	570 ovo.mL <sup>-1</sup> 19.18 %	0 ovo.mL <sup>-1</sup> -

Ces analyses mettent en évidence l'absence d'ovocytes dans le perméat et ce, dans les deux conditions de filtration testées. Il est donc possible de conclure de ces essais que ces espèces sont complètement retenues par ultrafiltration. L'abattement calculé sur un cycle de filtration varie entre 2,7 et 3,5 et entre 3,3 et 4,4 pour des temps de filtration de 30 et 60 min respectivement. Les concentrations récupérées dans les eaux de rétrolavage sont plus élevées que celles mesurées à l'entrée de la membrane. Contrairement au traitement des effluents contenant des spermatozoïdes, les rétrolavages avec une injection d'air préalable montrent un nombre d'ovocytes récupérés légèrement plus faible. Cependant, les analyses par cytométrie en flux, et plus précisément les tests d'intégrité révèlent un impact de l'injection d'air sur ces espèces récupérées dans l'eau de rétrolavage. En effet, les taux d'ovocytes non intègres présentés Tableau IV mettent en avant l'impact des nettoyages des membranes sur ces espèces et notamment dans le cas des RLess. C'est particulièrement le cas sur le cycle présenté jour 2 pendant lequel près de 20 % des ovocytes récupérés ne sont pas intègres. On constate que les taux d'intégrités en entrée de membrane ne sont pas similaires sur les différents échantillons analysés, ce résultat s'explique par la qualité des gamètes introduits, dépendante des géniteurs utilisés sur les différentes injections. Les observations au microscope (Figure 11) confirment clairement cette dégradation de la structure des ovocytes lors des rétrolavages essorés.

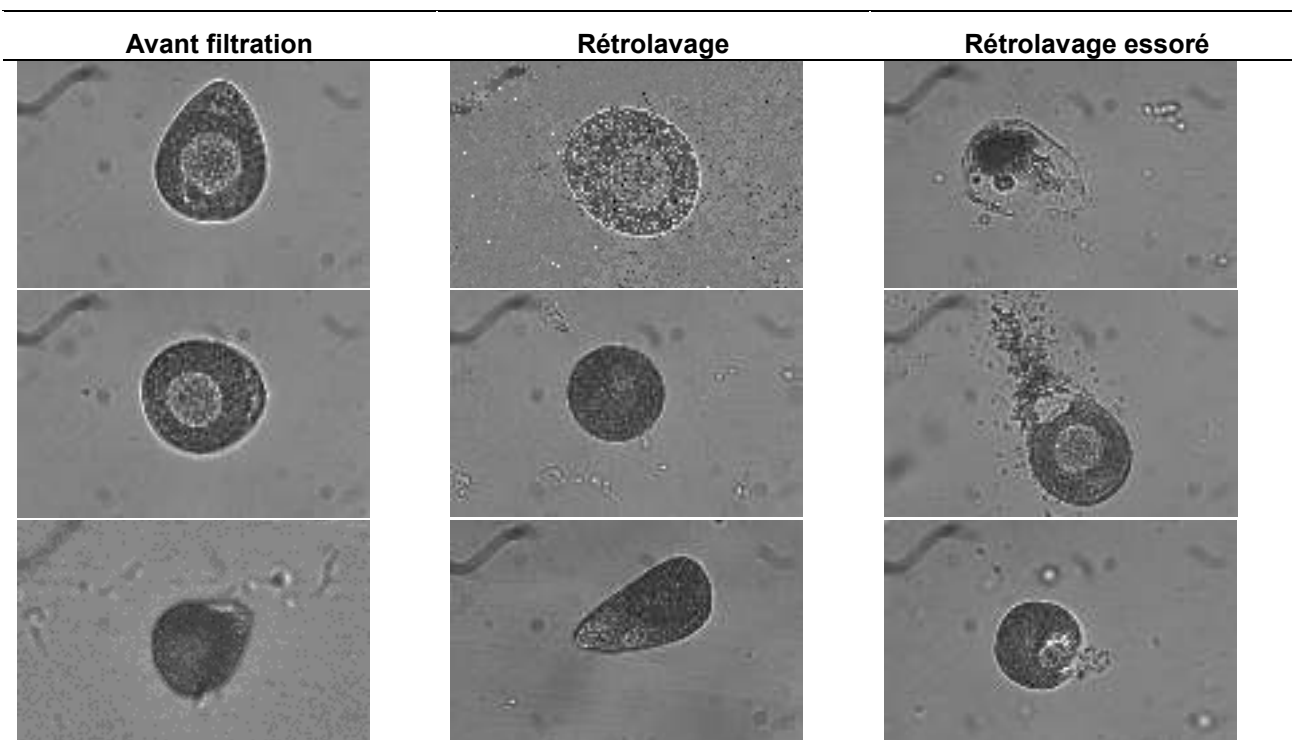


Figure 11 : Photos d'ovocytes avant filtration et dans les eaux de RL et RLess

### II.3.2 Pollution accidentelle

Comme pour la filtration d'effluents d'eau de mer contenant des spermatozoïdes, deux tests ont été effectués avec les mêmes conditions de filtration ( $J_{60}$  t60). L'évolution de la perméabilité sur 5h pour les deux essais est présentée Figure 12a. et b. La chute de perméabilité observée sur le premier cycle, de 350 (test 1) et 250  $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$  (test 2) comparée au test simulant une pollution chronique ( $<100 L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ ) reflète l'impact de la concentration des gamètes sur le colmatage de la membrane. L'importance des rétrolavages et rétrolavages essorés sur le contrôle du colmatage, comme pour les spermatozoïdes, est illustrée par ces évolutions de perméabilité.

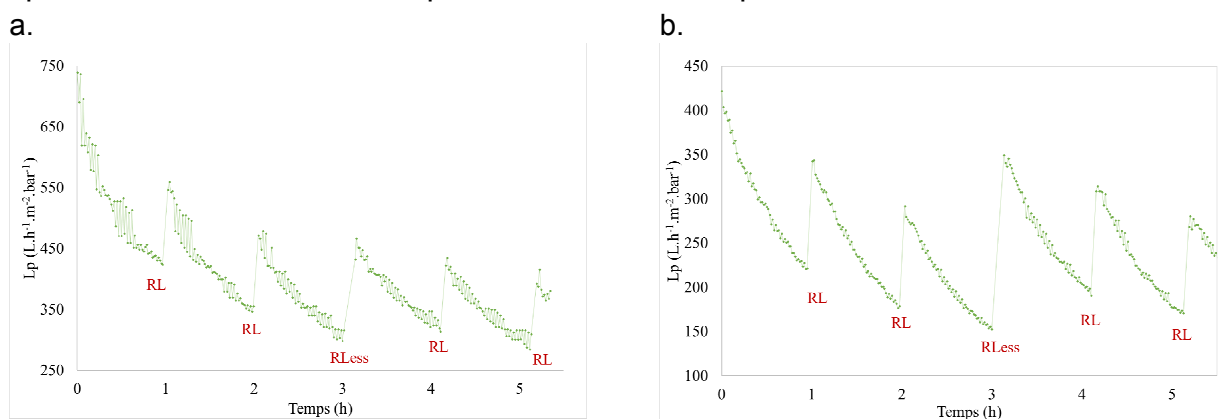


Figure 12 : Evolution de la perméabilité en fonction du temps – Traitement d'une pollution accidentelle d'ovocytes [ $J = 60 L.h^{-1}.m^{-2}$  ;  $t_{filtration} = 60 min$ ] - a. Test 1 et b. Test 2

L'évolution des concentrations à différents points du système pour les deux tests est présentée Figure 13a. et b. et les cytogrammes sur un cycle (Tableau V). L'absence d'ovocyte détecté par cytométrie en flux dans le perméat démontre encore une fois la totale rétention des ovocytes d'huîtres *Crassostrea gigas* par le procédé d'ultrafiltration,

même dans le cas d'un effluent fortement concentré (concentration quatre fois supérieure que dans le cas de traitement d'une pollution chronique, pour les mêmes conditions de filtration). Les abattements calculés sont compris entre 4,6 et 5 logs. Comme dans les premiers tests de traitement des ovocytes, les analyses par cytométrie en flux révèlent un impact de l'injection d'air dans la membrane avant rétrolavage sur l'intégrité physique des ovocytes puisque les taux d'ovocytes dégradés mesurés dans les différents échantillons sont de l'ordre de 50%.

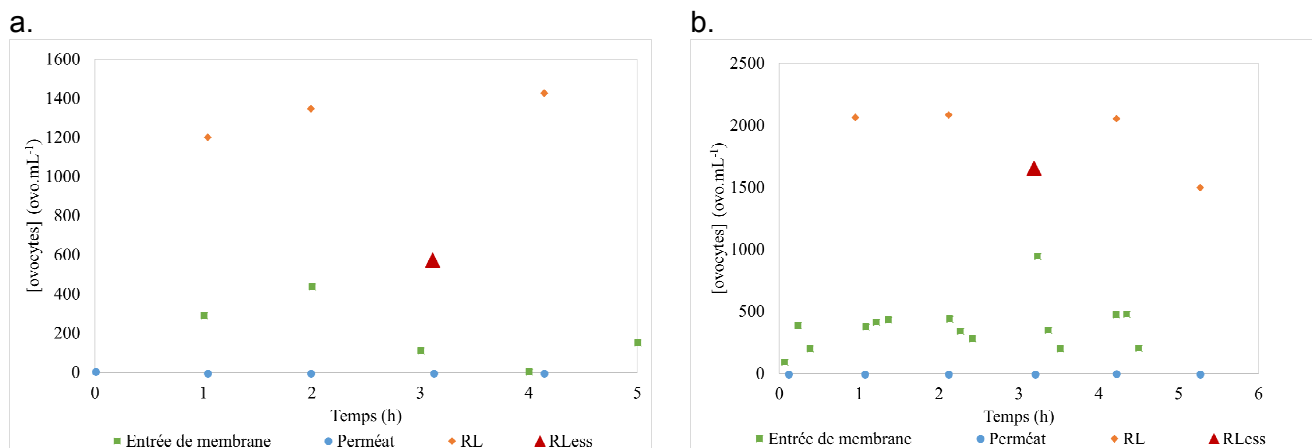


Figure 13 : Evolution de la concentration d'ovocytes en fonction du temps [ $J = 60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  ;  $t_{\text{filtration}} = 60 \text{ min}$ ; Pollution accidentelle] - a. Test 1 et b. Test 2

Tableau V : Résultats d'analyses par cytométrie en flux d'ovocytes, concentration et taux d'ovocytes non intègres [ $J = 60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  ;  $t_{\text{filtration}} = 60 \text{ min}$  ; Pollution accidentelle] pour deux concentrations d'alimentation

	Entrée de membrane	Rétrolavage	Rétrolavage essoré	Perméat
Test 1	255 ovo.mL <sup>-1</sup> 8,06 %	1 430 ovo.mL <sup>-1</sup> 11,73 %	1 355 ovo.mL <sup>-1</sup> 48,47 %	0 ovo.mL <sup>-1</sup> -
Test 2	400 ovo.mL <sup>-1</sup> 5,38 %	2 360 ovo.mL <sup>-1</sup> 6,14 %	1 535 ovo.mL <sup>-1</sup> 49,68 %	0 ovo.mL <sup>-1</sup> -

### III. CONCLUSION

L'objectif de développer un procédé de traitement des effluents d'élevage conchylicole susceptible de contenir du matériel biologique tétraploïde dont le rejet dans l'environnement est un risque pour la biodiversité marine, est atteint. La rétention des espèces à éliminer de ces effluents, spermatozoïdes et ovocytes d'huître *Crassostrea gigas*, par un procédé d'ultrafiltration a été évaluée et la résistance du process face à une eau de mer de qualité variable, contenant ou non des gamètes, a été suivie. L'absence de gamètes a été constatée dans les échantillons de perméat analysés par cytométrie en flux et ce résultat a été validé quelles que soient la pollution et sa concentration. Des abattements de 5 logs ont ainsi été obtenus. En termes de performances hydrauliques, l'addition de gamètes à l'eau de mer a montré un impact significatif sur le colmatage des membranes dans le cas du traitement d'effluents simulant des pollutions accidentelles. Nonobstant, les rétrolavages se sont montrés efficaces pour l'élimination de ce colmatage et maintien de conditions opératoires industrialisables. C'est notamment le cas des rétrolavages essorés (comportant une première étape de séchage de la membrane par injection d'air comprimé), qui jouent un rôle majeur dans le contrôle de la baisse des performances de filtration. Ces rétrolavages spécifiques permettent ainsi un nettoyage efficace des membranes en utilisant un volume proche du lavage conventionnel.

Contre toute attente, la concentration de spermatozoïdes obtenue dans l'eau des RLess était plus faible que dans celle des RL classiques, démontrant un impact sur l'intégrité de ces espèces, hypothèse confirmée par observation au microscope. Pour les ovocytes, l'intégrité des gamètes obtenus dans l'eau des RLess est plus faible que dans un RL. C'est la première fois qu'une étude montre l'impact généré par les RLess sur les performances hydrauliques ainsi que sur ce type de colmatage, et plus particulièrement sur l'intégrité des gamètes d'huîtres creuses. L'impact des RLess sur ces espèces est une information importante pour le développement industriel de ce procédé pour cette application.

La résistance du procédé a été testée sur les 7 mois d'essais. Que ce soit pour la filtration de l'eau de mer dans des conditions plus ou moins "douces" ou pour le traitement des effluents contenant des gamètes, les nettoyages chimiques réalisés à la fin se sont avérés efficaces pour le maintien d'une perméabilité stable, prouvant la flexibilité des membranes face aux effluents susceptibles d'être traités dans une exploitation conchylicole.

## RÉFÉRENCES

- [1] X. Guo, G. DeBrosse, S. Allen, All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids, *Aquaculture*. 142 (1996) 149–161. doi:10.1016/0044-8486(95)01243-5.
- [2] Benabdelmouna, Ledu, Production of bivalve tetraploid molluscs from diploid parents, Patent 2 146 569 B1, 2008.
- [3] R.N. Bamber, R. Seaby, J.M. Fleming, C. Taylor, Effects of entrainment passage on embryonic development of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, 33 (1994) 353–357.
- [4] Q. Li, M. Osada, M. Kashihara, K. Hirohashi, A. Kijima, Effects of ultraviolet irradiation on genetical inactivation and morphological features of sperm of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Fisheries Science*. 66 (2000) 91–96. doi:10.1046/j.1444-2906.2000.00013.x.
- [5] C. Stavrakakis, M. Papin, B. Dupuy, K. Riou, C. Penisson, M. Nourry, P.-J. Hatt, V. Buchet, H. Palvadeau, Désinfection de l'eau de mer – DESIMER Etude des sous-produits de désinfection, LSPC - Ifremer, 2017.
- [6] V. Lazarova, P. Savoye, M. Janex, E. Blatchley, M. Pommepuy, Advanced wastewater disinfection technologies: State of the art and perspectives, *Water Science and Technology*. 40 (1999) 203–213. doi:10.1016/S0273-1223(99)00502-8.
- [7] A. Kornmueller, Review of fundamentals and specific aspects of oxidation technologies in marine waters, *Water Science and Technology*. 55 (2007) 1–6. doi:10.2166/wst.2007.379.
- [8] S. Delacroix, C. Vogelsang, A. Tobiesen, H. Liltved, Disinfection by-products and ecotoxicity of ballast water after oxidative treatment – Results and experiences from seven years of full-scale testing of ballast water management systems, *Marine Pollution Bulletin*. 73 (2013) 24–36. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.06.014.
- [9] S. Reiser, S. Wuertz, J.P. Schroeder, W. Kloas, R. Hanel, Risks of seawater ozonation in recirculation aquaculture - Effects of oxidative stress on animal welfare of juvenile turbot (*Psetta maxima*, L.), *Aquatic Toxicology*. 105 (2011) 508–517. doi:10.1016/j.aquatox.2011.08.004.
- [10] J.M. Cobcroft, S.C. Battaglione, Ultraviolet irradiation is an effective alternative to ozonation as a sea water treatment to prevent *Kudoa neurophila* (Myxozoa: Myxosporidia) infection of striped trumpeter, *Latris lineata* (Forster), *Journal of Fish Diseases*. 36 (2013) 57–65. doi:10.1111/j.1365-2761.2012.01413.x.
- [11] C. Brown, D. Russo, Ultraviolet-Light Disinfection of Shellfish Hatchery Sea-Water .1. Elimination Of 5 Pathogenic Bacteria, *Aquaculture*. 17 (1979) 17–23. doi:10.1016/0044-8486(79)90134-0.
- [12] M. Gullian, F.J. Espinosa-Faller, A. Nunez, N. Lopez-Barahona, Effect of turbidity on the ultraviolet disinfection performance in recirculating aquaculture systems with low water exchange, *Aquaculture Research*. 43 (2012) 595–606. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02866.x.
- [13] R. Qualls, J. Johnson, Bioassay and Dose Measurement in UV Disinfection, *Applied and Environmental Microbiology*. 45 (1983) 872–877.

- [14] M. Szmukala, D. Szaniawska, Application of ceramic membranes in water treatment for fish hatchery supplying purposes, *Desalination*. 240 (2009) 117–126. doi:10.1016/j.desal.2007.12.038.
- [15] J.B. Castaing, A. Massé, V. Séchet, N.-E. Sabiri, M. Pontié, J. Haure, P. Jaouen, Immersed hollow fibres microfiltration (MF) for removing undesirable micro-algae and protecting semi-closed aquaculture basins, *Desalination*. 276 (2011) 386–396. doi:10.1016/j.desal.2011.03.081.
- [16] B. Gemende, A. Gerbeth, N. Pausch, A. von Bresinsky, Tests for the application of membrane technology in a new method for intensive aquaculture, *Desalination*. 224 (2008) 57–63. doi:10.1016/j.desal.2007.04.080.
- [17] G. Harvianto, Removal Organic Contaminants on Aquaculture Using Ultrafiltration Membranes, *Indonesian Scholars Journal*. (2013).
- [18] N. Ali, A. Mohammad, A. Jusoh, M. Hasan, N. Ghazali, K. Kamaruzaman, Treatment of aquaculture wastewater using ultra-low pressure asymmetric polyethersulfone (PES) membrane, *Desalination*. 185 (2005) 317–326. doi:10.1016/j.desal.2005.03.084.
- [19] G. Qin, C. Liu, N. Richman, J. Moncur, Aquaculture wastewater treatment and reuse by wind-driven reverse osmosis membrane technology: a pilot study on Coconut Island, Hawaii, *Aquacultural Engineering*. 32 (2005) 365–378. doi:10.1016/j.aquaeng.2004.09.002.
- [20] C. Guigui, M. Mougnot, C. Cabassud, Air sparging backwash in ultrafiltration hollow fibres for drinking water production, in: Hagemeyer, G and Schipper, JC and Gimbel, R (Ed.), *Membranes in Drinking and Industrial Water Production III*, Rhenish Westphalian Inst Water Res; KIWA NV Res; Int Water Assoc; European Desalinat Soc; Amer Water Works Assoc; Japan Water Works Assoc; German Water Works Assoc, 2003: pp. 415–422.
- [21] S. Laborie, C. Cabassud, L. Durand-Bourlier, J.M. Lainé, Fouling control by air sparging inside hollow fibre membranes—effects on energy consumption, *Desalination*. 118 (1998) 189–196. doi:10.1016/S0011-9164(98)00124-6.
- [22] P.J. Remize, C. Guigui, C. Cabassud, Evaluation of backwash efficiency, definition of remaining fouling and characterisation of its contribution in irreversible fouling: Case of drinking water production by air-assisted ultra-filtration, *Journal of Membrane Science*. 355 (2010) 104–111. doi:10.1016/j.memsci.2010.03.005.
- [23] C. Serra, L. Durand-Bourlier, M.J. Clifton, P. Moulin, J.-C. Rouch, P. Aptel, Use of air sparging to improve backwash efficiency in hollow-fiber modules, *Journal of Membrane Science*. (1999) 19.
- [24] P. Lipp, G. Baldauf, Application of out—in MF/UF-systems for drinking water treatment with air supported backwash — three case studies, *Desalination*. 147 (2002) 63–68. doi:10.1016/S0011-9164(02)00577-5.
- [25] P. Lipp, M. Witte, G. Baldauf, A.A. Povorov, Treatment of reservoir water with a backwashable MF/UF spiral wound membrane, *Desalination*. 179 (2005) 83–94. doi:10.1016/j.desal.2004.11.057.
- [26] R. Moll, D. Veyret, F. Charbit, P. Moulin, Dean vortices applied to membrane process - Part I. Experimental approach, *Journal of Membrane Science*. 288 (2007) 307–320. doi:10.1016/j.memsci.2006.11.030.
- [27] Guilbaud, Wyart, Klaag, Moulin, Comparison of seawater and freshwater ultrafiltration on semi-industrial scale: ballast water treatment application, *Journal of Membrane Science and Research*. (2018).
- [28] J. Vignier, A.K. Volety, A. Rolton, N. Le Goic, F.-L.E. Chu, R. Robert, P. Soudant, Sensitivity of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) spermatozoa and oocytes to dispersed oil: Cellular responses and impacts on fertilization and embryogenesis, *Environmental Pollution*. 225 (2017) 270–282. doi:10.1016/j.envpol.2016.11.052.
- [29] N. Le Goic, H. Hegaret, M. Boulais, J.-P. Beguel, C. Lambert, C. Fabioux, P. Soudant, Flow Cytometric Assessment of Morphology, Viability, and Production of Reactive Oxygen Species of *Crassostrea gigas* Oocytes. Application to Toxic Dinoflagellate (*Alexandrium minutum*) Exposure, *Cytometry Part A*. 85A (2014) 1049–1056. doi:10.1002/cyto.a.22577.