THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

PAR LA VALIDATION DES ACQUIS DE L'EXPÉRIENCE

Année universitaire 2022-2023

École doctorale GAIA

Biodiversité, agriculture, alimentation, environnement,terre, eau

Spécialité : Sciences de la mer

Unité mixte de recherche MARBEC – MARine Biodiversity Exploitation and Conservation

SYNTHÈSE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

Une aquaculture durable en milieu contraint, contrôlé et extrême

Présentée par Cyrille PRZYBYLA

Le 08 décembre 2023

Devant le jury composé de

Mme Maria DARIAS, Directrice de recherche, IRD	Présidente du Jury
Mme Christelle ADAM-GUILLERMIN, Cadre scientifique des EPIC, IRSN	Rapporteure
M. Rodolphe GOZLAN, Directeur de recherche, IRD	Directeur de thèse
M. Jean-Luc MOREL, Chargé de recherche, CNRS	Rapporteur

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements

Encadrer une thèse en VAE implique, de la part d'un directeur de thèse, d'investir du temps pour l'accompagnement du candidat, sans avoir de retour direct sur son sujet de recherche ou dans la vie quotidienne dans son laboratoire. Je tiens donc à exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de thèse Rodolphe Gozlan, directeur de recherche IRD, pour sa disponibilité, ainsi que pour nos échanges constructifs et inspirants durant la préparation de ce manuscrit.

Je souhaite adresser un remerciement aux membres de mon jury de thèse : Christelle Adam-Guillermin, directrice de recherche en radiobiologie à l'IRSN de Cadarache ; Jean-Luc Morel, chercheur CNRS en neurosciences spatiales à l'université de Bordeaux ; Maria Darias, chargée de recherche en aquaculture basée en Afrique du Sud.

Je remercie les personnes de l'Ifremer ayant consulté, soutenu et retenu mon projet de thèse en interne : Wilfried Sanchez, de la direction scientifique ; Tristan Renault, responsable du département RBE ; Thierry Laugier, de l'unité MARBEC ; Myriam Callier, responsable du laboratoire L3AS de la plateforme expérimentale de Palavas-les-Flots.

Je remercie le service formation continue de l'université de Montpellier pour la gestion de mon dossier, ainsi que Sylvie Pellizza pour son *coaching* sur la rédaction du parcours professionnel.

Certaines rencontres durant mes deux décennies de carrière à l'Ifremer ont façonné ma personnalité scientifique, accompagnant mon évolution professionnelle jusqu'à cette candidature au grade de docteur en *sciences de la mer*. En premier lieu, je remercie mes aînés, que je considère comme des pionniers dans le domaine de l'aquaculture moderne, pour m'avoir, chacun à sa manière, montré ou inculqué leur vision de la méthodologie expérimentale. Merci à Éric Saillant, Christian Fauvel, Denis Covès, Béatrice Chatain, Jean-Paul Blancheton et Gilles Lemarié.

D'autres collègues d'expérimentations continuent de m'inspirer au quotidien, après avoir contribué à ma formation au fil des années. Je tiens à remercier vivement Éric Gasset, Gilbert Dutto et Emmanuel Mansuy pour leur approche des défis scientifiques et expérimentaux, ainsi que pour leur bienveillance journalière.

Et puis, on trouve parfois des soutiens au quotidien qui contribuent au plaisir de travailler tous ensemble dans ce métier passion qu'est la biologie marine. Un grand merci à Sébastien Triplet, Thibault Geoffroy, Marie-Odile Blanc, Stéphane Lallement et Alain Vergnet pour le partage de leur savoir et pour les moments amicaux.

Enfin, que serait un projet de thèse en VAE sans le soutien de sa propre famille, qui endure les discussions répétitives, les questionnements et les doutes d'un candidat au grade de docteur en sciences de la vie. Merci à ma femme Sandrine, à nos enfants Marie et César, et au dernier arrivé Diego, qui réalisera, plus tard, que son grand-père a soutenu une thèse en 2023.

Table des matières

1 CONTEXTE DE L'AQUACULTURE MONDIALE 15

1.1 Les systèmes de production piscicole 16

1.1.1 La pisciculture en bassin de terre ou en étang : mutation d'une culture ancestrale 16

1.1.2 La pisciculture en cage flottante : un conflit d'usage 17

1.1.3 La pisciculture en eau recirculée : un élevage aux contraintes économiques 18

1.1.4 L'apport nutritionnel du poisson d'aquaculture dans l'alimentation humaine 19

2 LES AQUACULTURES DURABLES 21

2.1 Profils d'intrants d'une production de poissons 22

2.1.1 L'alimentation extensive en milieu ouvert 22

2.1.2 L'alimentation formulée en cage et en milieu recirculé 23

2.1.3 Vers des sources alternatives de matières premières pour l'alimentation aquacole 24

2.2 Profils des extrants d'une production de poissons 24

2.2.1 Les rejets dissous et particulaires en milieu ouvert 24

2.2.2 Rejets dissous et particulaires en milieu recirculé 26

2.3 Des aquacultures durables : une notion de durabilité plurielle 27

2.3.1 Une sécurité alimentaire pour les pays à revenus faibles ou intermédiaires 27

2.3.2 Une préoccupation environnementale pour les pays à infrastructure technologique avancée 28

2.4 Vers une aquaculture multitrophique intégrée (AMTI) 29

2.4.1 Deux exemples d'AMTI en milieu extensif renforçant la sécurité alimentaire 29

2.4.2 L'AMTI en milieu ouvert marin : une contre-mesure à la dispersion des rejets 30

2.4.3 Une AMTI intégrée aux systèmes RAS : objectif zéro rejet 32

3 UNE APPROCHE PAR COMPARTIMENT 35

3.1 Comprendre et contrôler une polyculture de microalgues marines en lagunage à haut rendement algal : l'exemple de la régulation par le CO_2 36

3.1.1 Introduction 36

3.1.2 Matériels & méthodes 37

3.1.3 Résultats et discussion 39

3.1.4 Conclusions 43

4 UNE APPROCHE EN CASCADE TROPHIQUE 45

4.1 Effet bénéfique de l'inclusion d'une polyculture de microalgues marines épuratrices d'effluents aquacoles dans l'alimentation de microalgues marines du bar européen (*Dicentrarchus labrax*) 46

4.1.1 Introduction 46

4.1.2 Matériels & méthodes 47

4.1.3 Résultats et discussion 51
5 L'APPROCHE INNOVANTE DE l'AQUACULTURE SPATIALE 61
5.1 Exploration spatiale : l'étude de cas d'une aquaculture en milieu contraint, clos et contrôlé ..62
5.1.1 De l'eau dans le système solaire ? 64
5.1.2 Pourquoi l'organisme aquatique est-il un bon candidat pour un système biorégénératif lunaire ? 65
5.1.3 Une AMTI sur la Lune : une innovation technologique en milieu clos, contrôlé et extrême 66
5.1.4 Les missions spatiales avec poissons d'aquarium pour la recherche en médecine 67
5.1.5 Les missions spatiales avec des embryons de poissons d'aquarium 68
5.1.6 Les missions spatiales avec poissons d'aquaculture 68
5.1.1 Un essai d'écosystème aquatique en microgravité 69
5.1.2 Le programme LUNAR HATCH 71
5.2 Influence des vibrations d'un lanceur spatial sur l'embryogenèse de deux espèces de poissons d'aquaculture 72
5.2.1 Introduction 72
5.2.2 Matériels & méthodes 73
5.2.3 Résultats et discussion 77
5.2.4 Conclusion 80
5.3 Influence de l'hypergravité et de la microgravité sur l'embryogenèse d'un poisson d'aquaculture 82
5.3.1 Introduction 82
5.3.2 Matériels & méthodes 85
5.3.3 Résultats et discussion 92
5.3.4 Conclusion 100
6 PERSPECTIVES 101
6.1 Fédérer une stratégie de recherche en AMTI à l'échelle nationale ou européenne 102
6.2 L'aquaculture urbaine : une production semi-extensive en milieu contrôlé 102
6.3 Feuille de route de la recherche en aquaculture spatiale 104
6.3.1 Compléter l'étude des paramètres environnementaux 104
6.3.2 L'étude des effets environnementaux combinés 105
6.3.3 Missions spatiales de preuve de concept 106
6.3.4 Collaborations académiques et partenariats industriels 107
7 CONCLUSION GÉNÉRALE 108
8 BIBLIOGRAPHIE 109
9 ANNEXES 124

Résumé

Ce manuscrit de thèse est le fruit d'une rédaction réalisée dans le cadre d'une validation des acquis de l'expérience (VAE). Un premier volet résume mon cheminement professionnel durant vingt-deux années d'activités de recherche en aquaculture marine en milieu contrôlé. À sa suite, le document de thèse basé sur cinq de mes publications met en lumière les projets menés sur le thème de l'aquaculture multitrophique intégrée (AMTI) durant ces treize dernières années à l'Ifremer. La dernière partie de cette thèse développe une idée, à la fois novatrice et avant-gardiste, d'une application de l'AMTI en milieu extrême, à travers le projet de mise en place d'une production piscicole en milieu contraint, contrôlé et extrême sur la Lune.

Le sujet central de cette thèse est le thème des *aquacultures durables*. Les différents systèmes de productions aquacoles à travers le monde seront rappelés en associant leurs limites contextuelles et leurs impacts directs ou indirects sur l'environnement. La production d'aliments formulés sur des ressources prélevées dans l'environnement (intrant), ainsi que la diffusion dans l'environnement de rejets dissous ou particulaires (extrant) sont les deux principaux axes de réflexion.

À l'image de la diversité des systèmes aquacoles, les contre-mesures que propose le concept d'AMTI sont spécifiques au modèle de production.

L'AMTI compartimentée en milieu ouvert est une cascade trophique avec un système de traitement de l'eau en recirculation. Le compartiment accueillant les microalgues en polyculture est probablement le plus important à maîtriser. Il est nécessaire de porter une attention particulière aux paramètres abiotiques et de décrire la diversité de l'écosystème qui s'y installe. À l'image d'un puzzle, les compartiments associés de l'AMTI nécessitent l'étude approfondie de l'interaction potentielle entre les organismes. Par exemple l'usage des microalgues marines en consortium naturel comme source alimentaire primaire pour les poissons d'aquaculture. La conceptualisation d'une AMTI compartimentée, qui peut à la fois recycler les molécules et les particules émises par les poissons, et fournir directement une source d'alimentation aquacole, permet d'imaginer un tel système dans l'un des environnements les plus extrêmes qu'est la Lune.

L'idée de l'aquaculture spatiale utilisant une AMTI en milieu contraint et contrôlé est pionnière et complémentaire aux recherches mondiales actuelles sur des serres de végétaux terrestres sur la Lune ou Mars. Toutefois, il est nécessaire de s'assurer qu'il est possible d'acheminer des embryons de poissons sur la Lune alors qu'ils seront soumis à un changement drastique d'environnement, à commencer par les secousses provoquées par le lancement d'un engin spatial. L'étude de la gravité altérée causée par l'accélération d'une fusée ou l'arrivée en orbite révèle que les larves de bar en condition d'hypergravité ou de microgravité ne sont ni en état de stress, ni en surconsommation d'oxygène. Une feuille de route dévoile la méthodologie expérimentale à suivre pour les années à venir.

Il existe un effet miroir entre les challenges de recyclage de l'activité aquacole sur Terre, avec un objectif de préservation de l'environnement, et le recyclage dans l'espace pour l'exploration spatiale. Il est probable qu'une aquaculture nouvelle apparaisse prochainement sur Terre avec l'idée de la consommation en circuit court associé à la technicité d'une AMTI en compartiments contrôlés. C'est le concept de l'aquaculture urbaine basée sur de multiples voies de recyclage et de consommation au cœur de nos mégapoles.

Ainsi, ce document de thèse intitulé « une aquaculture durable en milieu contraint, contrôlé et extrême » met en lumière mes recherches en cours sur l'aquaculture durable en proposant un scénario plausible en milieu extrême pour un futur proche.

Mots-clés : Aquaculture multitrophique intégrée, aquaculture spatiale, aquaculture urbaine, European Seabass, microalgues, gravité altérée, traitement de l'eau, vibration lanceur.

Abstract

This thesis manuscript is the result of writing carried out as part of a Validation of Acquired Experience (VAE). The first part summarizes my professional development during 22 years of research activities in marine aquaculture in a controlled environment. Following this, the thesis document based on five of my publications, will highlight the projects carried out on the theme of integrated multi trophic aquaculture (IMTA), carried out over the last 13 years at Ifremer. The last part of this thesis will develop an idea that is both innovative and disruptive, of an application of IMTA in an extreme environment through the project of setting up fish production in a constrained, controlled and extreme environment on the moon.

The main and pivotal subject of this thesis is the theme of sustainable aquacultures. The different aquaculture production systems around the world will be referenced, associating their contextual limits and their direct or indirect impacts on the environment. The production of foods formulated with resources taken from the environment (input) as well as the diffusion into the environment of dissolved or particulate waste (output) are the two main axes of reflection.

Like the diversity of aquaculture systems, the countermeasures offered by the IMTA concept are specific to the production model.

The open compartmented IMTA is a trophic cascade with a looped water treatment system. The compartment hosting the microalgae in polyculture is probably the most important to master. It is necessary to control the abiotic parameters and describe the diversity of the ecosystem that occurs there. Like a puzzle, the associated compartments of the IMTA require the in-depth study of the potential interaction between organisms such as the use of marine microalgae in natural consortium as a food source for the fish of the primary loop.

The conceptualization of a compartmentalized IMTA that can both recycle the molecules and particles emitted by fish and directly provide a source of aquaculture food, makes it possible to imagine such a system in one of the most extreme environments: The Moon.

The idea of space aquaculture using an IMTA in a constrained and controlled environment is a new idea and complementary to current global research on terrestrial plant greenhouses on the Moon or Mars. However, it is necessary to ensure that it is possible to transport fish embryos which will experience a drastic change in environment beginning with the tremors caused by the launch of a space mission. The study of altered gravity caused by the acceleration of a rocket or the arrival in orbit reveals that sea bass larvae in conditions of hypergravity or microgravity are not in a state of stress nor in overconsumption of oxygen. A roadmap reveals the experimental methodology to follow in the years to come.

There is a mirror effect between the challenges of recycling aquaculture activity on Earth with the objective of preserving the environment, and recycling in space for space exploration. It is likely that a new aquaculture will soon appear on Earth with the idea of short circuit consumption and the technicality of an IMTA in controlled compartments. This is the concept of urban aquaculture based on multiple avenues of recycling and consumption in the heart of our megacities.

Thus, this thesis document entitled “sustainable aquaculture in a constrained, controlled and extreme environment” highlights my current research on sustainable aquaculture by proposing a plausible scenario in an extreme environment for the near future.

Key words: Altered gravity European seabass, Integrated multi trophic aquaculture, launcher vibration microalgae, space aquaculture, urban aquaculture water treatment.

Liste des figures

***Figure 1**. Évolution mondiale de l'activité aquacole comparée à la pêche sur 70 ans. Extrait de FAO, 2022. ..... 15*
***Figure 2** . Cages d'élevage marin au Monténégro (©Radzonimo). Principe de modélisation de la dispersion des nutriments des cages d'élevage en mer d'après le modèle Barbeau (©Ifremer). 17*
***Figure 3**. Schéma de principe d'un système d'aquaculture en recirculation : (1) Bassin autonettoyant, (2) Filtre à mailles rotatives (3) Pièges à particules-excréments, (4) Bassin tampon avec contrôle du pH et de la température, (5) Pompe de recirculation, (7) Filtre bactérien nitrifiant, (8) Colonne d'extraction du CO_2, (9) Système de réoxygénation de l'eau, (10) Distributeur d'aliments aquacoles sur demande du groupe de poissons. Extrait de Franco-Nava et al. (2004). 19*
***Figure 4**. Apport des nutriments essentiels du poisson d'aquaculture pour l'alimentation humaine. Extrait de Tacon et al. (2020). 20*
***Figure 5.** Consommantion humaine de produits d'origine aquatiques issus de la pêche (bleu) ou de l'aquaculture (grenat). 21*
***Figure 6**. Relation entre les pêcheries de poissons sauvages et l'alimentation formulée pour l'aquaculture. Extrait de Martinell et al. (2020). 24*
***Figure 7**. Exemple de la France, balance commerciale des échanges de produits aquatiques (pêche et aquaculture), types d'organismes et propositions sur le marché de la consommation (source : FranceAgrimer 2022). 28*
***Figures 8**. (A) Impacts environnementaux potentiels d'une cage en mer ouverte (©open Ocean). (B) Contre-mesures proposées par l'intégration de plusieurs organismes, par niveaux trophiques, autour des cages pour réduire l'impact environnemental (©Fisheries and Oceans Canada). 31*
***Figures 9**. (A) Dispositif de collecte d'excréments de poissons en système RAS (©Przybyla). (B) Bioconversion des déchets particulaires organiques d'élevage de poissons par une culture de détritivores dont les vers aquatiques (©Bardelli). 32*
***Figure 10**. Polyculture naturelle et spontanée de microalgues marines, développée en bassin de culture à haut rendement algal à Palavas-les-Flots en 2016. ..... 37*
***Figure 11**. Schéma de principe des deux séries d'expérimentations en lagunage à haut rendement algal pour l'évaluation de la production de la biomasse en fonction du pH. 38*
***Figure 12**. Efflorescence spontanée de microalgues marines en consortium naturel de la série 1 après 15 jours de culture. 38*
***Figure 13**. Synthèse des enregistrements de valeurs de pH en fonction des valeurs cibles maintenues par injection de CO_2 pur dans la polyculture des LHRA expérimentaux. 39*
***Figure 14**. La diversité des microalgues a été déterminée à l'aide de l'analyse du gène de l'ARNr 18S. La première expérience s'est déroulée du 17 mai au 22 juin 2016 (A-D). Organismes identifiés en début d'expérience (A) et ceux identifiés en fin d'expérience dans des LHRA à pH 6 (B), pH 7 (C) et pH 8 (D). La deuxième expérience s'est déroulée du 27 juin au 26 juillet 2016 (E-H). Organismes identifiés au début de l'expérience (E) et à la fin de l'expérience dans les LHRA à pH 6 (F), pH 7 (G) et pH 8 (H). 40*
***Figure 15**. Fractions de taille de la biomasse algale (mesures chl a) mesurées dans les LHRA à pH 6, pH 7 et pH 8 lors du premier essai expérimental (A) et du deuxième essai expérimental (B). 41*
***Figure 16.** Concentration de la biomasse carbonée mesurée dans les LHRA (moyenne et écart-type des triples échantillons) lors du run 1 du 17 mai au 22 juin 2016 (A), et lors du run 2 du 27 juin au 26 juillet 2016 (B). 43*
***Figure 17**. Principe des cultures d'algues associées à un système de support de vie biorégénératif dans l'espace. Extrait de Yang et al. (2019b). 44*
***Figure 18**. Coupes histologiques de l'intestin antérieur (coloration bleu alcian / PAS, pH = 2,5) de bar européen. Longueur des villosités (VL), musculeuse externe (couche longitudinale externe OLL et couche circulaire interne ICL) ; largeur des villosités (VW), cellules caliciformes (AGC acide et NGC neutre). 50*
***Figure 19**. Activité enzymatique spécifique de SI, maltase, ALP et γ-GT dans PC, P et D du bar européen nourri avec les régimes expérimentaux pendant 75 jours. Les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart-type (n=9). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les régimes de traitement (exposant minuscule $P < 0,05$, exposant majuscule $P < 0,001$). Alkaline phosphatase (ALP), sucrase-isomaltase (SI), γ-glutamyl transpeptidase (γ-GT). Pyloric caeca (PC), distal intestine (D), proximal int*

estine (P). 56
***Figure 20.** Bilan hydraulique de la Terre (océans, rivières, lacs, calottes glaciaires, eaux souterraines) comparé au bilan hydraulique estimé des océans sur Europe, Ganymède et Titan (crédits : PHL@UPRArecibo-JPL/Caltech). 64*
***Figure 21.** Production d'origine biologique de CO_2 issu de la respiration de divers animaux d'élevage, exprimée en kg de gaz émis par kg de biomasse animale (Przybyla, 2021). 65*
***Figure 22.** Indices de conversion de divers animaux d'élevage (source : MMC first process). 66*
***Figure 23.** Schéma du module spatial aquatique CEBAS démontrant le concept de l'écosystème naturel équilibré en eau douce, comportant poissons d'aquarium, escargots, plantes et bactéries (extrait de Bluem et al., 2000). 70*
***Figure 24**. Plan de l'enceinte expérimentale et disposition sur le simulateur de vibrations d'un lanceur Soyouz (Przybyla et al., 2020). 73*
***Figure 25**. Protocole expérimental de la simulation de décollage Soyouz avec un triplicata de LCS exposé (orange) et triplicata de LCS témoin (bleu). Évaluation finale du taux d'éclosion après exposition de 10 min aux vibrations Soyouz (Przybyla et al., 2020). 76*
***Figure 26**. Taux d'éclosion de l'expérimentation en vibration orbitale. Résultats en pourcentages à hpf 56 et hpf 71 pour le module LCS exposé, le témoin en bécher et le module LCS témoin. 77*
***Figure 27**. Taux d'éclosion du bar européen après simulation d'un lancement Soyouz (test de qualification standard – 10 min) sur des embryons au stade de développement 35 hpf et 83 hpf pour des conditions testées en triplicata : module LCS vibré et un LCS témoin non vibré. 79*
***Figure 28.** Taux d'éclosion du maigre après une simulation de lancement Soyouz (test de qualification standard – 10 min) sur des embryons à 14 hpf testés en triplicata : module LCS vibré et un LCS témoin non vibré. 79*
***Figure 29**. Protocole expérimental d'exposition à la microgravité (vert), à l'hypergravité (bleu), et conditions industrielles (marron), de la fertilisation du Dicentrarchus labrax à l'analyse du taux d'éclosion et l'échantillonnage pour analyse de transcrits de gènes de stress et d'immunologie. 85*
***Figure 30**. Transfert des lots d'embryons destinés aux expérimentations de gravité altérée sur la plateforme GEPAM de l'ESA à Nancy (©V.Ribière). 87*
***Figures 31**. (**A**) (**B**) Mini-bassin expérimental (230 ml) à l'intérieur d'un CubeSat (n = 100 œufs) utilisé dans cette expérience, ainsi que dans les expériences précédentes (voir paragraphe 5.2), pour évaluer l'impact des vibrations de lancement de fusée sur le taux d'éclosion des poissons d'aquaculture. (**C**) Rotor aquatique (de 1 g à 5 g) avec réservoirs expérimentaux en triple exemplaire contenant des embryons de bar européen (n = 100 chacun). (**D**) Machine de positionnement aléatoire avec un CubeSat contenant des embryons de bar européen (n = 100) exposés pendant 39 heures de microgravité simulée et le CubeSat de contrôle (n = 100). (**E**) Sonde d'oxygène PSt3 et lumière transmise par la fibre optique au point du capteur pour mesurer la concentration en oxygène à l'intérieur de la fenêtre CubeSat. (**F**) Transfert des données sur la concentration en oxygène vers l'ordinateur. 88*
***Figure 32**. Évaluation du taux d'éclosion du bar européen (Dicentrarchus labrax) d'une famille de frères et sœurs dans des conditions simulées de gravité modifiée et de contrôle industriel. Dans l'expérience d'hypergravité, trois CubeSats ont été exposés pendant 10 minutes, et trois témoins n'ont pas été exposés (n = 100 embryons de poissons chacun). Dans l'expérience de microgravité, un seul CubeSat (n = 100 embryons) a été exposé à la microgravité simulée pendant 39 heures, et le groupe témoin (n = 100 embryons) n'a pas été exposé. Le témoin industriel a été élevé dans des conditions optimales. Les résultats sont exprimés en moyenne ± ET pour l'expérience d'hypergravité (n = 3). 93*
***Figure 33**. Concentration d'oxygène à l'intérieur du CubeSat pour le groupe exposé (n = 100 embryons) et le groupe témoin (n = 100 embryons), et courbes de tendance pendant l'expérience de microgravité simulée. La différence entre la pente du groupe de microgravité et du groupe témoin n'est pas significative (P = 0,8074). . 94*
***Figure 34**. Effets de l'exposition à l'hypergravité (10 minutes à 5 g) et à la microgravité simulée (39 heures sur le RPM) sur Dicentrarchus labrax valeur RIN moyenne. Les résultats sont exprimés en moyenne ± ET. La différence statistiquement significative a été trouvée en utilisant le test t de Student. **p<0,05. ..... 96*
***Figure 35.** Effets de l'exposition du bar européen (Dicentrarchus labrax) à l'hypergravité (10 minutes à 5 g) ou à la microgravité simulée (39 heures sur un RPM) sur les niveaux d'ARNm des récepteurs glucocorticoïdes 1 et 2 (GR1, GR2). Les valeurs relatives obtenues avec des embryons témoins ont été fixées à 1. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type. 97*

Figure 36. *Effets de l'exposition à l'hypergravité (10 minutes à 5 g) ou à la microgravité simulée (39 heures sur un RPM) sur les niveaux d'ARNm du Dicentrarchus labrax Hsp90α. Les valeurs relatives obtenues avec des embryons témoins ont été fixées à 1. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type. 98*
Figure 37*. Effets de l'exposition à l'hypergravité (10 minutes à 5 g) ou à la microgravité (39 heures sur un RPM) sur les niveaux d'ARNm C3 et IL-1β chez Dicentrarchus labrax. Les valeurs relatives obtenues avec des embryons témoins ont été fixées à 1. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± ET. Des différences statistiquement significatives ont été trouvées à l'aide des tests t de Student. * p<0,05, *** p<0,001. ..... 99*
Figure 38. *Diverses méthodes de cultures d'algues en AMTI milieu clos et contrôlé, (1) photobioréacteur, (2) récolte en biofilm, (3) système ouvert en bassins, d'après Yang et al. (2019a). 103*
Figure 39. *Rayonnements secondaires dans l'habitacle d'un véhicule spatial et leurs contre-mesures. Pouvoir de pénétration du neutron dans un aquarium. ©Canadian nuclear safety commission 105*
Figure 40. *L'atterrisseur européen Argonaut et l'emblème de la mission biologique sur la Lune « BioMoon ». ©ESA. 106*
Figure 41. *Feuille de route du programme LUNAR HATCH. En vert, les projets déjà réalisés en simulation terrestre. En jaune, les projets en cours de développement en simulation terrestre. En rouge, les projets de preuve de concept planifiés lors de missions spatiales. 107*

Liste des tableaux

Tableau 1*. Abondance de tous les principaux groupes de protozoaires et de métazoaires identifiés par microscopie dans le LHRA à pH 6, pH 7 et pH 8 au début et à la fin des deux essais expérimentaux de l'étude. . 42*
Tableau 2*. Ingrédients (g/100 g) et composition proximale, teneur en phosphore et en énergie des régimes testés et de l'aliment commercial (CTRL). 48*
Tableau 3*. Valeurs moyennes et extrêmes des paramètres physico-chimiques de l'eau d'élevage en RAS. 49*
Tableau 4*. Concentration potentielle en acides gras d'intérêt pour les souches du consortium algal cultivé sur un profil d'effluent de pisciculture. Travail bibliographique. 52*
Tableau 5*. Composition biochimique de la farine du consortium algal cultivé sur un profil d'effluent piscicole. 53*
Tableau 6*. Performances zootechniques du bar européen en fonction de la qualité des aliments expérimentaux. 54*
Tableau 7*. Indices biométriques après 75 jours d'expérimentation avec les aliments expérimentaux. 54*
Tableau 8*. Coefficients de digestibilité apparente des nutriments et de l'énergie (%) des régimes expérimentaux. 55*
Tableau 9*. Gradient de concentrations de cendres dans les formulations expérimentales et indices de conversion alimentaire chez le bar. 58*
Tableau 10*. Paramètres environnementaux de l'expérimentation en rotation orbitale et du test de qualification de vibrations Soyouz. 74*
Tableau 11*. Paramètres de fréquences vibratoires du test de qualification du lanceur Soyouz 75*
Tableau 12*. Accélération des lanceurs lunaires américains en unité de gravité g 89*
Tableau 13*. Plan d'échantillonnage pour l'analyse des biomarqueurs de stress et immunologie innée. Une seule aliquote a été prélevée sur chaque CubeSat exposé à l'hypergravité (HG1 ; HG2 ; HG3) et sur chaque CubeSat témoin. Pour l'expérience de microgravité simulée, trois aliquotes ont été prélevées sur le seul CubeSat (MG1) exposé à la microgravité et sur le contrôle. 90*
Tableau 14*. Amorces utilisées pour effectuer les analyses qPCR des différentes cibles (F : avant, R : inverse) 91*
Tableau 15*. Comparaison de la consommation individuelle d'oxygène (µg/œuf/h) dans l'expérience de microgravité simulée par rapport à la littérature sur d'autres espèces marines, en fonction de la température de l'eau 95*

Liste des abréviations

1g	Unité conventionnelle de l'accélération gravitationelle sur Terre
AGPI	Acide gras poly-insaturé
AMTI	Aquaculture multi-trophique intégrée
BLSS	Bioregenerative life-support system
BLSS	Bio-régénérative life support system
Chl a	Chlorophylle a
ECLS	Environmental control and life-support system
FAO	Food Agriculture Organization
GEPAM	Gravitational Experimental Platform for Animal Models
GR	Glucocorticoid receptor
HGE	Hypergravity experiment
hpf	Hours post fertilization
Hpf	Hour post fertilization
ISS	International space station
LEO	Low Earth orbit
LHRA	Lagunage à haut rendement algal
PSU	Practical salinity unit
RAS	Recirculating aquaculture system
RIN	RNA integrity number
RPM	Random positioning machine
SMGE	Simulated microgravity experiment

1 CONTEXTE DE L'AQUACULTURE MONDIALE

Corrélée à l'expansion de l'humanité et à l'augmentation du niveau de vie des sociétés, la demande alimentaire en produits aquatiques (halieutique et aquaculture) a considérablement crû ces dernières décennies, pour atteindre un niveau record de 214 millions de tonnes en 2020 : 178 millions de tonnes d'animaux aquatiques et 36 millions de tonnes d'algues. La consommation annuelle moyenne humaine (à l'exclusion des algues) est de 20,2 kg par habitant, soit plus du double de la moyenne de 9,9 kg par habitant enregistrée dans les années 1960. *Aquaculture* est le nom donné à l'ensemble des activités qui produisent des organismes aquatiques destinés aux humains ou aux animaux, à des fins alimentaires. Elle se pratique en eau douce (rivières, étangs, barrages), en eau saumâtre ou en milieu marin. On distingue deux grandes familles d'organismes aquacoles ayant une biologie très différente : d'une part, les organismes photosynthétiques primaires, qui se composent de plusieurs classes d'algues et pour lesquels on parlera d'algoculture ; d'autre part, les productions animales, parmi lesquelles se trouvent les poissons (pisciculture), les coquillages (conchyliculture) et les crustacés (dont la pénéiculture). La production aquacole mondiale en 2022 s'élevait à 122,6 millions de tonnes, dont 87 millions de tonnes d'animaux aquatiques et 35 millions de tonnes d'algues. Le continent le plus actif dans ce domaine est l'Asie, qui contribue largement à la production mondiale avec 91 % de l'activité aquacole mondiale. Si nous devions décrire le profil de la principale production aquacole au monde, cela serait probablement une carpe élevée en Asie. La production de l'ensemble des continents progresse, à l'exception de l'Afrique qui, toutefois, reste un fort potentiel de développement sur ce secteur (FAO, 2022).

Avec une demande mondiale grandissante de produits aquatiques et une régression récurrente des captures halieutiques, la consommation de produits d'aquaculture dépasse parfois les sources halieutiques (figure 1) : c'est le cas pour le poisson en France.

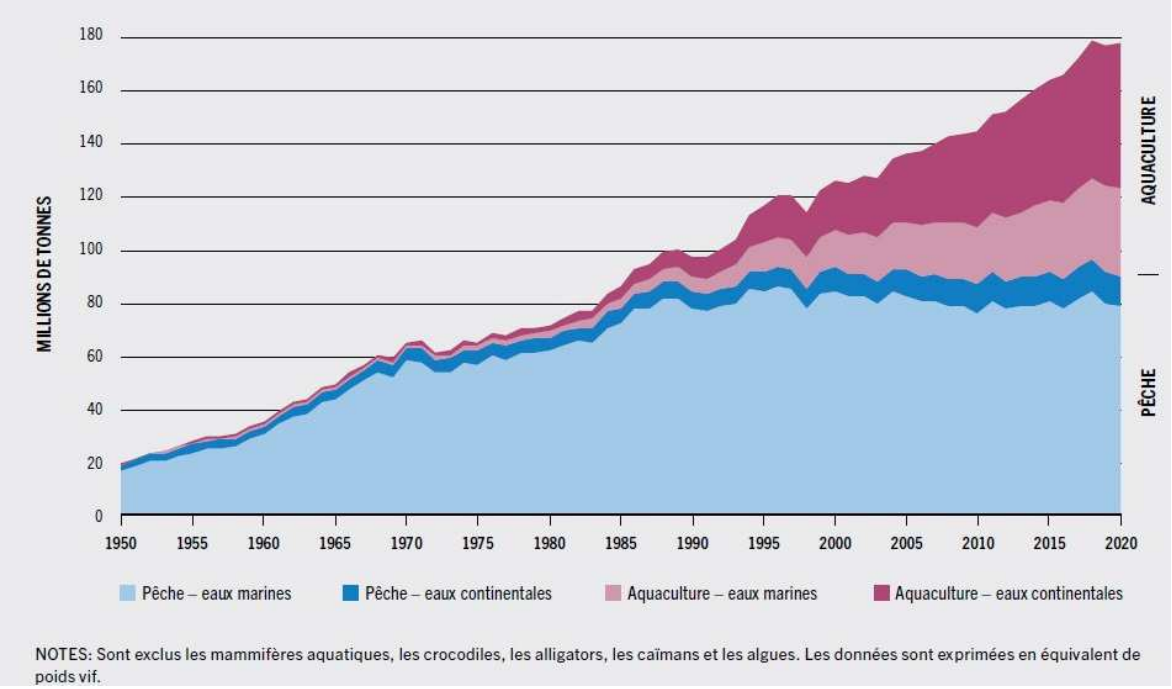


***Figure 1**. Évolution mondiale de l'activité aquacole comparée à la pêche sur 70 ans. Extrait de FAO, 2022.*

La croissance de l'aquaculture d'environ 3 % par an depuis 1961 s'est souvent faite au détriment de l'environnement. Les projections de l'activité aquacole mondiale pour 2022-2027 prédisent une croissance annuelle de 4,43 % sur cette période (FAO, 2022). Le développement d'une aquaculture durable (la notion sera développée au chapitre 2) reste donc un objectif crucial pour répondre à la demande grandissante de produits alimentaires d'origine aquatique afin de nourrir une population mondiale (hors alimentation d'animaux d'élevages terrestres) estimée à 10 milliards d'humains en 2050.

1.1 Les systèmes de production piscicole

La pisciculture mondiale propose plusieurs profils de systèmes de production de poissons. L'élevage extensif (défini au paragraphe 1.1.1), dans un bassin de terre par exemple, est destiné à un circuit court de consommation, et contribue à un renforcement de la sécurité alimentaire des populations locales. Les élevages intensifs de poissons en circuits recirculés (notion définie au paragraphe (1.1.3) sont développés par des structures ayant accès à une ressource financière importante, à l'énergie et à la technologie. Ces productions intensives sont souvent destinées à un modèle économique qui produit et exporte des poissons à haute valeur ajoutée, et se situent dans une région du monde qui importe ces denrées alimentaires.

1.1.1 La pisciculture en bassin de terre ou en étang : mutation d'une culture ancestrale

La pisciculture en étang ou en bassin de terre, qui a nourri plusieurs générations d'humains à travers les millénaires, est une forme d'aquaculture contribuant largement à la sécurité alimentaire des populations locales, qui se développe dans l'esprit du circuit court. Ce dispositif de circularité est désormais convoité par les pays du Nord, ancrés historiquement dans la consommation à l'échelle mondiale.

Ce sont majoritairement des élevages en eau douce en milieu ouvert sur l'environnement. Cette pisciculture contribue à la majorité de la production piscicole mondiale, et repose sur des espèces à niveau trophique faible, dont les cyprinidés, qui représentent plus de 60 % de la production mondiale. On a coutume de dire que la Chine est le berceau historique de la pisciculture à grande échelle. À l'origine, la polyculture asiatique en eau douce (notion développée dans le paragraphe 2.3.1) est fertilisée avec des ressources de l'écosystème local, et se compose de productions naturelles telles que des amas bactériens, des efflorescences algales, une source planctonique, mais aussi des résidus et des restes d'alimentation humaine. Ce système ancestral qui a fait ses preuves se retrouve aujourd'hui confronté à différentes mutations. Attirés par une productivité plus intensive, certains producteurs en extensif sont attirés vers la monoculture, ce qui induit une baisse de la variabilité génétique, de la diversité écologique, ainsi que l'émergence de nouvelles maladies (FAO, 2012). Une démarche productiviste de ces systèmes traditionnels incite les éleveurs de cyprinidés en Chine, en Inde ou encore au Bangladesh à l'usage d'aliments composés, c'est-à-dire des granulés formulés industriellement. Ainsi, 40 % de la production mondiale d'aliment pour poissons est destinée à l'élevage de la carpe, alors qu'initialement, ce poisson d'élevage pouvait s'alimenter avec les sources locales de productions primaires et biologiques (Kaushik, 2014).

1.1.2 La pisciculture en cage flottante : un conflit d'usage

La cage flottante est aussi considérée comme un système ouvert pour une production plus intensive que les bassins ou les étangs. Ce dispositif d'aquaculture est composé d'une enceinte close par un filet délimitant un espace d'élevage pour un cheptel de poissons. Ce filet est attaché, en pleine mer ou dans une retenue d'eau, à une structure flottante à travers laquelle est maintenue une libre circulation d'eau fournissant un renouvellement de la qualité de cette dernière, une oxygénation, et possiblement une infime partie de l'alimentation aquacole (figure 2). Les principaux avantages de ce système par rapport aux structures en étang ou en bassin de terre résident dans l'adaptabilité de la structure et l'utilisation directe du renouvellement de l'eau du milieu naturel. Ainsi, en Asie par exemple, le long du Mékong, on peut trouver des trains de cages, qui peuvent se déplacer en fonction du débit du fleuve. L'application de bonnes pratiques d'élevage inhérentes à ce système de production, comme la distance entre les cages et les densités de poissons de ces dernières, permet d'éviter l'autopollution des sites, et prévient de la possible contamination des cheptels d'une cage à l'autre, en cas de crise sanitaire. On retrouve des systèmes de production de poissons en cages sur tous les continents. En Asie et en Afrique principalement, des cages sont aussi installées sur des barrages continentaux. La pratique de l'élevage marin en cage est moins répandue que celle de l'élevage en eau douce. Les volumes considérables de la production globale font de l'Asie l'un des principaux utilisateurs de filets flottants (Halwart, 2007). Cependant, l'immersion des cages dans un écosystème aquatique naturel peut avoir des impacts directs ou indirects sur la biodiversité, par exemple la possible fuite dans le milieu naturel de saumons domestiqués (Soto *et al.*, 2001), qui ainsi s'hybrident avec les populations sauvages, la tentation d'utiliser contre les maladies ou le parasitisme des produits pharmaceutiques, qui peuvent interagir avec l'environnement (Manna *et al.*, 2020), ou la dégradation de la qualité de l'eau (Pitta *et al.*, 2009).

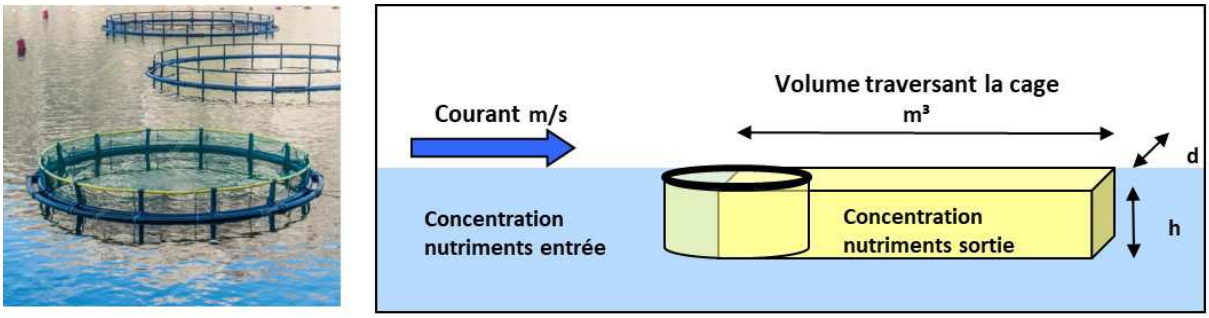


***Figure 2** . Cages d'élevage marin au Monténégro (©Radzonimo). Principe de modélisation de la dispersion des nutriments des cages d'élevage en mer d'après le modèle Barbeau (©Ifremer).*

Dans les pays du Nord, l'élevage intensif en cage est la principale composante de l'aquaculture des pays riches. C'est l'industrie du saumon qui est leader dans cette méthode d'élevage, suivie des producteurs de daurades et de bars en Méditerranée. Toutefois, en Europe principalement, au cours de ces dernières décennies, ce type de monoculture intensive a été confronté à des conflits d'usage, notamment liés à l'usage de l'eau douce à des fins agricoles. Pour les cages en mer, l'occupation de l'espace littoral par l'activité touristique et le prix du foncier cristallisent les conflits d'usage, freinant ainsi le développement de l'aquaculture marine (Milstein, 2005). La France est largement dépendante des importations de poissons d'aquaculture dont le système de production se trouve sur un autre continent alors qu'elle possède le second plus grand domaine maritime au monde avec plus de 10 millions de km^2. Les principaux producteurs de poissons en cages sont la Chine, la Norvège, le Chili, le Japon, le Royaume-

Uni et le Vietnam. Contrairement aux systèmes extensifs, cette méthode d'élevage de poissons d'aquaculture, essentiellement en monoculture, dépend totalement de l'alimentation industrielle formulée, ainsi que des aléas des facteurs abiotiques liés à la météorologie du site d'implantation.

1.1.3 La pisciculture en eau recirculée : un élevage aux contraintes économiques

Afin de s'affranchir des contraintes environnementales et d'anticiper une crise de la disponibilité de l'eau, le secteur de l'aquaculture industrielle a misé sur le développement des systèmes de production de poissons en bassins avec de l'eau recirculée, souvent hors sol. L'enceinte d'élevage déconnectée du milieu naturel est aussi une mesure de prévention contre l'échappement accidentel d'espèces aquacoles natives ou pas dans le milieu naturel, que l'on peut parfois observer dans le système de production en cage (Soto *et al.*, 2001). L'idée majeure est d'élever les poissons à fortes densité et croissance, dans un circuit d'eau rebouclé sur lui-même et réutilisant l'eau d'élevage après un traitement spécifique. Le principe en est de réduire la concentration des molécules nocives dissoutes dans l'eau et d'extraire les particules en suspension afin de réutiliser l'eau dans des conditions acceptables pour les performances de croissance de l'organisme aquacole élevé. Les matières dissoutes sont issues du métabolisme du poisson (digestion, respiration, activité basale). Les particules en suspension sont essentiellement constituées de matières organiques telles que les excréments de poissons. On trouve aussi, selon les espèces, des écailles perdues par fragilité, par blessures, ou par le renouvellement de la surface du tégument. La description de la composition des matières dissoutes ou en suspension excrétées et les moyens de traitements seront détaillés au paragraphe 2.2.

L'appellation « circuit clos de production », qui est parfois rencontrée dans la presse ou dans certaines publications, est improprement utilisée. En effet, en général, une boucle recirculée, qu'elle soit électrique, électronique ou hydraulique, perd de l'énergie par dissipation d'énergie, dont l'évaporation. Dans le cas d'un circuit hydraulique, l'apport d'eau exogène au circuit est réduit au minimum. Le terme adéquat est « système recirculé aquacole », et nous parlerons dans ce document de RAS (en anglais : *Recirculating Aquaculture System*). Cette méthode de production est aussi utilisée pour l'aquariophilie, et se compose *a minima* d'un filtre biologique utilisant des bactéries autotrophes, ainsi que d'une filtration dite « mécanique » pour retenir et évacuer les fèces et les macroparticules en suspension. Le RAS requiert les mêmes maillons de traitement, qu'il soit en eau douce ou en eau de mer (figure 3). Seules les bactéries du filtre biologique changent, car il est nécessaire qu'elles soient adaptées à l'environnement de production. Certains poissons d'eau douce, tels que le poisson-chat africain (*Clarias gariepinus*), sont plus robustes à une qualité de l'eau dégradée : cela permet de mettre en œuvre de fortes densités d'élevage en RAS, avec des débits de recirculation plus réduits que pour les autres espèces (Strauch *et al.*, 2018).

Si l'un des avantages du RAS est une empreinte réduite sur la disponibilité en eau, ouvrant la porte à des productions industrielles dans des régions arides ou désirant préserver l'environnement, il convient de souligner que cette technologie est directement liée à la disponibilité en énergie pour le fonctionnement de la boucle de recirculation. Éclairage, dispositif automatique de distribution d'aliment, traitement de l'eau, besoins domestiques, fonctionnement des pompes, le coût électrique d'un RAS a été évalué aux environs de 6,7 kWh par kilogramme d'aliment distribué (Blancheton *et al.*, 2009). Dans ce contexte, ce dispositif convient aux structures commerciales ayant la capacité de produire ou d'acheter une source d'énergie compatible avec le schéma économique de la production piscicole. Le rendement financier de la production est intimement lié au stade de vie de l'espèce élevée et à la conversion en biomasse de

l'aliment distribué. Le RAS permet un contrôle de la distribution alimentaire avec une possibilité de réduire le gaspillage du non-ingéré. Les systèmes en eau recirculée ont été principalement développés en eau douce, en Europe et sur le continent nord-américain.

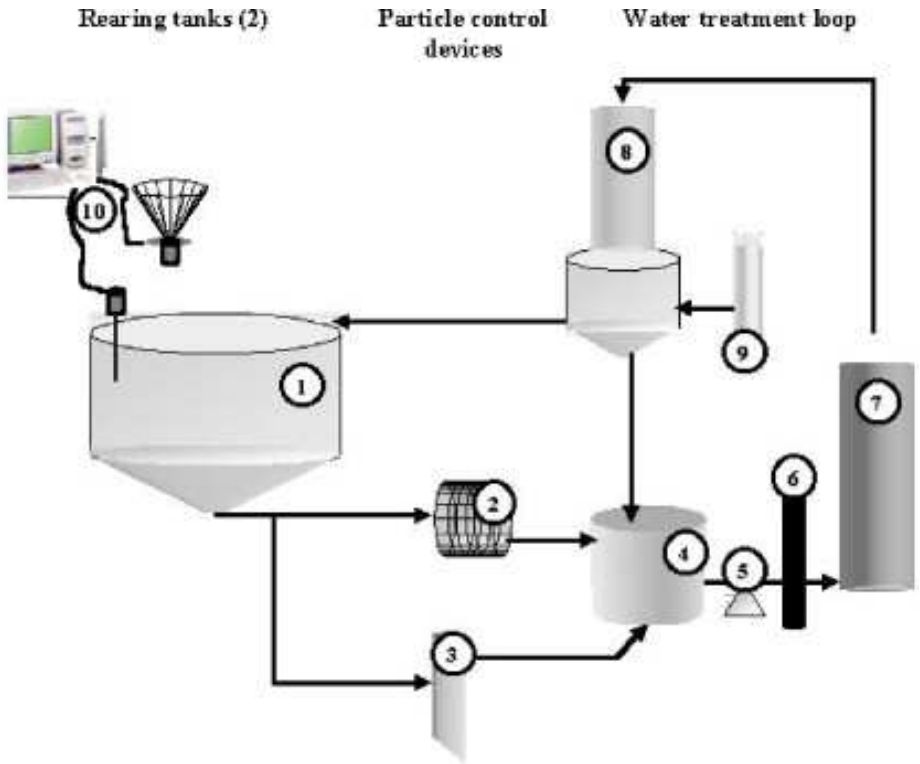


***Figure 3**. Schéma de principe d'un système d'aquaculture en recirculation : (1) Bassin autonettoyant, (2) Filtre à mailles rotatives (3) Pièges à particules-excréments, (4) Bassin tampon avec contrôle du pH et de la température, (5) Pompe de recirculation, (7) Filtre bactérien nitrifiant, (8) Colonne d'extraction du CO_2, (9) Système de réoxygénation de l'eau, (10) Distributeur d'aliments aquacoles sur demande du groupe de poissons. Extrait de Franco-Nava* et al. *(2004).*

L'usage d'un système de pisciculture recirculé en milieu contrôlé pourrait contribuer à maintenir une production biosécurisée de poissons dans un contexte de contrainte environnementale impulsée par un dérèglement climatique (Reverter *et al.*, 2020) pouvant impliquer une crise virale (Combe *et al.*, 2023) chez les producteurs de poissons.

1.1.4 L'apport nutritionnel du poisson d'aquaculture dans l'alimentation humaine

Les produits aquatiques, et particulièrement le poisson, sont des vecteurs d'apports de protéines et d'acides gras de qualité pour l'alimentation humaine. Une consommation régulière est un facteur d'équilibre alimentaire pour les populations mondiales. Les mérites nutritionnels et les bienfaits protecteurs ont été abondamment décrits au cours du siècle dernier. Comme pour les poissons sauvages, la chair des poissons d'aquaculture séquestre des protéines à haute digestibilité, ainsi que des acides aminés et des lipides d'intérêt, dont les acides gras polyinsaturés essentiels (AGPI). On retrouve aussi des vitamines et des minéraux très importants pour le maintien musculaire. Ces vitamines sont des précurseurs de molécules jouant un rôle dans la catalyse enzymatique. Lorsque la synthèse de coenzymes n'est pas exprimée par le patrimoine génétique d'un organisme (c'est le cas de l'*Homo sapiens*), l'apport doit se faire par l'ingestion de cellules végétales ou animales ayant synthétisé ou stocké

ces composés. En plus des micronutriments, plusieurs poissons d'aquaculture marine, d'eau douce ou saumâtre ont la capacité physiologique de séquestrer l'acide linoléique (ALA) de leur régime alimentaire, et de le transformer, par élongation de la chaîne carbonée C18-ALA, en acide eicosénoïque C20-EPA ou en acide docosahexaénoïque C22-DHA (Gregory et al., 2016; Morais et al., 2015; Tocher, 2015). L'ensemble des composés d'intérêt dans un régime alimentaire à base de poissons est présenté dans la figure 4.

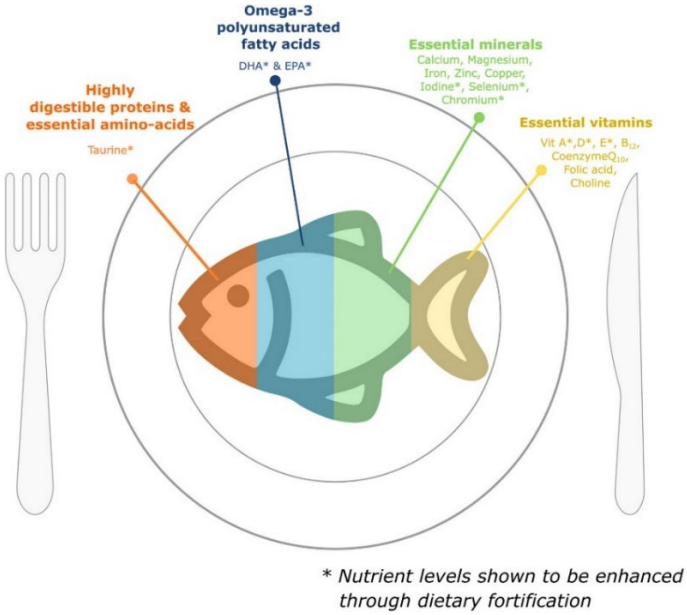


***Figure 4**. Apport des nutriments essentiels du poisson d'aquaculture pour l'alimentation humaine. Extrait de Tacon* et al. *(2020).*

La couverture des besoins protéiques de l'homme est d'environ 23 kg par habitant et par an. Le poisson contribue dans certains pays, notamment l'Asie, à 50 % de l'apport protéique d'origine animale En Europe, cette contribution n'est que de l'ordre de 7 % (Kaushik, 2014). La croissance la plus forte de la consommation de produits aquacoles concerne les poissons d'eau douce et les poissons diadromes, dont la consommation annuelle par habitant a presque quintuplé, passant de 1,5 kg en 1961 à 8,2 kg en 2019. Cette évolution reflète la consommation de l'Asie en poissons d'eau douce, ainsi que la forte demande de saumons et de truites en Europe et en Amérique du Nord, et de tilapias dans différents pays.

La consommation de poissons d'aquaculture, qui représente 75 % de la consommation totale d'organismes aquacoles, a dépassé en 2020 la fourniture d'organismes aquatiques d'origine sauvage (figure 5).

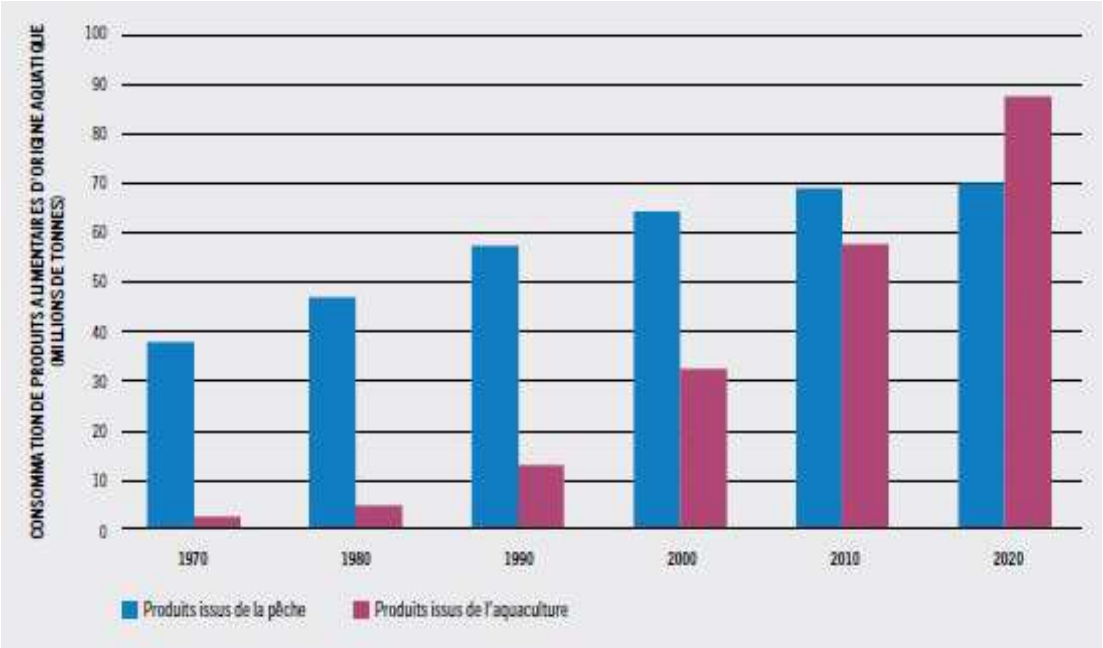


Figure 5. *Consommantion humaine de produits d'origine aquatiques issus de la pêche (bleu) ou de l'aquaculture (grenat). Extrait FAO (2022).*

2 LES AQUACULTURES DURABLES

La notion d' aquacultures durables se décline en plusieurs composantes. La durabilité de la production de la filière reste l'axe principal de réflexion sur le sujet. Comment soutenir un rythme de production en adéquation avec une demande croissante des produits de la mer ? Avec un modèle extensif ou intensif, comment pérenniser économiquement les acteurs de production de la filière ? L'extraction de poissons d'un système aquacole intensif est intimement liée à l'apport de l'intrant alimentaire, lui-même dépendant des matières premières nécessaires pour sa formulation. Ainsi, par un effet de cascade, le sujet de la durabilité en production intensive dépend de la durabilité d'approvisionnement des matières premières de la formulation des granulés. De plus, la qualité digestible des sources de matières premières de l'intrant alimentaire (végétales, ou poissons issus de la pêche minotière) impacte directement la productivité globale du système de production. La composition de l'alimentation formulée est donc un sujet majeur de recherche dans le cadre de l'aquaculture durable.

Dans le modèle de production extensive, l'alimentation est fournie par le milieu naturel, et reste dépendante d'un écosystème naturel productif équilibré. Pour les systèmes utilisant les alimentations formulées (granulés commerciaux), ici aussi, la durabilité de la filière passe par la disponibilité de la matière première utilisée dans les formulations d'aliments aquacoles. L'efficacité de transformation de l'alimentation aquacole est un levier pertinent qui peut s'appréhender, non seulement à travers l'optimisation de la digestibilité des formulations, mais aussi par une sélection d'espèces ou de souches d'espèces ayant une capacité de transformation intéressante. La sélection génétique de lignées par des caractères de performance d'efficacité alimentaire nécessite d'établir des croisements pertinents. Il semblerait que l'aptitude à convertir les nutriments alimentaires chez le poisson soit un caractère héritable (Besson et al., 2019; de Verdal et al., 2018). Le choix de l'organisme élevé en fonction des contraintes

abiotiques et sa sélection génétique permettraient de se rapprocher de l'objectif d'une digestibilité optimale.

Optimiser la digestibilité et la transformation en biomasse réduit biologiquement les rejets dissous et particulaires dans l'eau d'élevage. L'amélioration de la qualité de l'eau de rejet des systèmes de production piscicole, ainsi que la réduction des nutriements emis dans la nature, sont des sujets majeurs de la durabilité de l'aquaculture, une durabilité appréhendée non plus sous l'angle de la production, mais sous celui de l'impact de l'activité piscicole sur l'environnement de production. L'enjeu est de recycler l'eau d'élevage de poissons en évitant l'usage de la chimie industrielle ou le traitement mécanique, et en préférant la culture complémentaire d'organismes avec potentiellement une valeur économique. On parle non plus de traitement de l'eau mais de valorisation d'effluents aquacoles.

Les consommateurs issus des pays les plus riches souhaitent désormais que les produits d'origine aquacole soient de qualité nutritionnelle élevée avec un minimum de traitements (voire pas du tout), et élevés dans des systèmes préservant l'environnement. Cela demande aux filières de production de poissons d'imaginer l'intégration du concept de durabilité dans leur chaîne. Comparé au secteur de la pêche, le secteur piscicole peut s'adapter plus rapidement et plus efficacement à l'évolution des préférences des consommateurs, car les producteurs peuvent avoir le contrôle de plusieurs maillons de production. On observe un potentiel d'adaptabilité croissant du système de production en lien avec le gradient de fermeture du circuit. L'objectif de l'aquaculture durable est bien de mettre en œuvre des solutions biologiques pouvant contribuer à l'objectif du « tout recyclé » et du « zéro déchet ».

2.1 Profils d'intrants d'une production de poissons

2.1.1 L'alimentation extensive en milieu ouvert

L'alimentation aquacole extensive repose sur les ressources naturelles disponibles dans l'environnement, principalement du phytoplancton, du zooplancton, ainsi que d'autres amas bactériens présents naturellement dans l'eau. Ce type d'alimentation est utilisé dans des systèmes en milieu naturel, comme des étangs, des lagunes, ou des bassins creusés. Les interventions humaines sont limitées, et sont consacrées au suivi de la santé des animaux et à la gestion de l'environnement. Cette approche d'alimentation populaire dans les pays à faibles revenus dont la ressource économique est limitée permet de réduire les coûts associés à l'achat d'aliments commerciaux et autres technologies. L'alimentation aquacole extensive contribue généralement à une empreinte environnementale plus faible, car elle s'appuie sur les ressources d'alimentations aquacoles locales, et n'implique pas l'utilisation de grandes quantités d'aliments, souvent importés, d'antibiotiques ou de produits chimiques. Elle est souvent utilisée dans des zones où les conditions naturelles sont favorables à la croissance des organismes aquatiques. Par exemple, le taux de croissance des populations de poissons élevés en extensif est plus faible qu'en aquaculture intensive, car il est basé sur une alimentation d'opportunisme moins équilibrée et moins riche que les granulés formulés (Jobling, 1986).

Il est essentiel de souligner que l'alimentation aquacole extensive propose des avantages de mise en œuvre, toutefois limitée à des projets de petite échelle (mais nombreux) dans des zones où les conditions naturelles sont particulièrement favorables à l'élevage extensif. Cette source alimentaire est pertinente dans le cadre d'une économie circulaire à circuit court avec un objectif de sécurité alimentaire pour les populations locales.

2.1.2 L'alimentation formulée en cage et en milieu recirculé

L'intrant alimentaire en cage est basé sur le même modèle que l'aquaculture intensive en milieu recirculé, c'est-à-dire sur les formulations industrielles de granulés. La qualité nutritionnelle est optimisée, mais la prise alimentaire et la croissance sont dépendantes de la température du lieu d'immersion des cages. Ainsi, la transformation alimentaire par les poissons est meilleure qu'en élevage extensif grâce à la quantité d'aliment régulièrement distribuée et à l'équilibre nutritionnel des formulations. Cependant, la prise alimentaire de la biomasse de poisson est contrainte par la température de l'eau. Le non-ingéré alimentaire peut être une source alimentaire pour les espèces sauvages autour des cages, et se disperser avec les courants ou se déposer sur les fonds. Les structures les plus technologiques, notamment dans la production du saumon en Norvège, sont dotées de capteurs optiques pouvant stopper la distribution lorsque des granulés non ingérés sont détectés en fond de cage.

L'alimentation en pisciculture intensive est donc constituée de granulés formulés pour répondre aux besoins nutritionnels spécifiques à chaque souche de poissons élevés (NRC, 2011). Cette alimentation favorise une croissance rapide et efficace pour une production optimale, et permet d'accélérer les cycles d'extraction de poissons. Grâce aux aliments formulés, les nutriments essentiels fournis aux animaux sont contrôlés précisément afin d'optimiser l'indice de conversion. Cet indice correspond à la masse d'aliments consommés divisée par le gain de poids de la biomasse élevée (Medale and Kaushik, 2008). Certains aliments formulés peuvent contenir des suppléments nutritionnels spécifiques pour renforcer la santé des animaux, ou stimuler l'immunologie et améliorer leur résistance aux maladies (Carbone and Faggio, 2016). Cependant, dans les circuits en recirculation dont l'investissement est une part importante de la production, ce gain de performance biologique est économiquement mitigé par le coût énergétique d'un circuit recirculé, la main-d'œuvre nécessaire à son bon fonctionnement et l'achat d'aliments. Ce dernier constitue le poste majeur de dépense de fonctionnement (Besson *et al.*, 2019). Ces aliments formulés industriellement sont généralement fabriqués à partir de matières premières telles que des protéines de farine de poisson, des huiles de poisson, des farines de céréales, des vitamines, des minéraux (Kaushik *et al.*, 1998). Les besoins alimentaires spécifiques à chaque espèce de poisson ou de crevette élevée sont disponibles dans le *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp* édité par le National Research Council (NRC, 2011).

L'alimentation aquacole moderne implique un approvisionnement continu en aliments commerciaux de qualité constante pour soutenir la croissance et la production des espèces aquacoles. Bien que l'alimentation aquacole formulée ait permis d'augmenter la production de poissons, cette dernière se trouve face à des défis environnementaux tels que la dépendance à l'approvisionnement en poissons pélagiques sauvages, destinés à la production de farines protéiques et d'huiles riches en acides gras d'intérêt pour la production d'aliments. Ainsi, pour l'élevage intensif, les poissons d'eau douce ou de mer, quel que soit leur stade de vie post-larvaire, sont nourris sur une base de matières premières prélevées dans les stocks naturels d'autres espèces de poissons sauvages. L'expansion de l'aquaculture basée sur l'alimentation formulée pose la question de la durabilité de cette méthode sur l'équilibre écologique de nos océans, et par cascade sur la pérennité de cette filière.

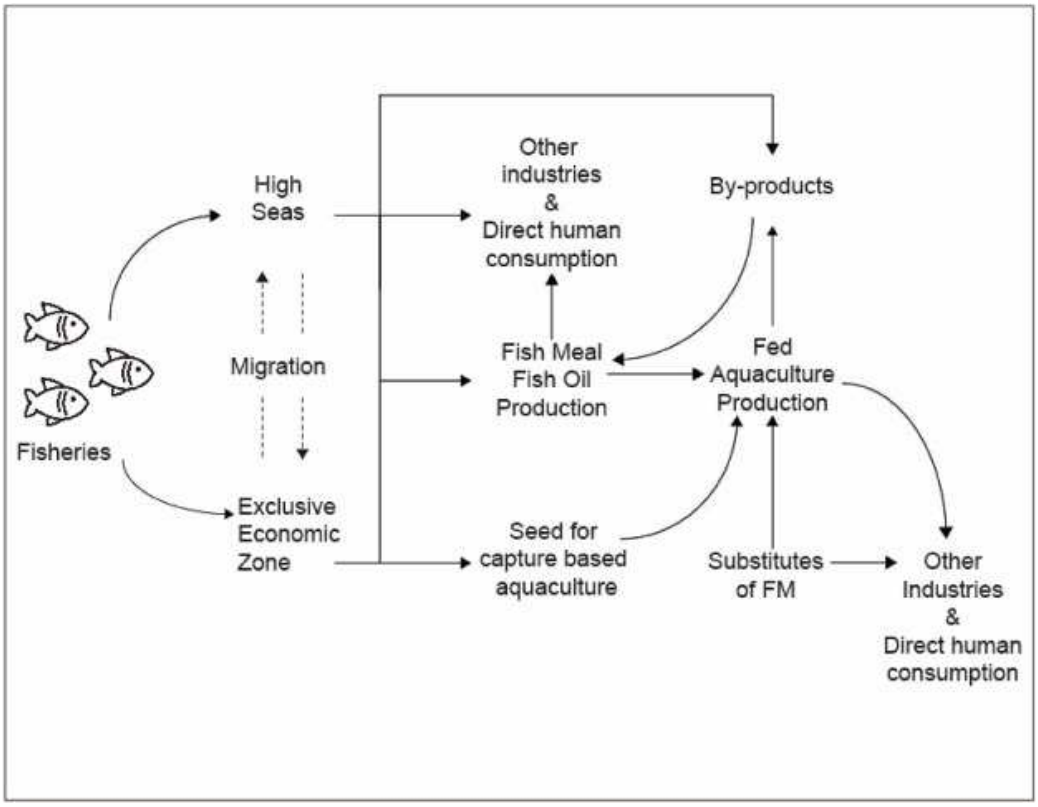


***Figure 6**. Relation entre les pêcheries de poissons sauvages et l'alimentation formulée pour l'aquaculture. Extrait de Martinell* et al. *(2020).*

2.1.3 Vers des sources alternatives de matières premières pour l'alimentation aquacole

La recherche en nutrition aquacole s'est emparée du sujet de la substitution des farines et des huiles de poisson par des matières premières alternatives à la fin des années 2000. Des efforts de recherche sont engagés pour développer des aliments alternatifs pour la pisciculture intensive (Perez-Pascual *et al.*, 2020) à base de végétaux terrestres (Castro et al., 2016; Corraze and Kaushik, 2009; Santigosa et al., 2011), de sous-produits agricoles (Ayer et al., 2007; Thompson et al., 2008), de microalgues (voir le paragraphe 4.1) ou d'insectes (Barroso et al., 2014; Tran et al., 2015), afin de réduire le prélèvement environnemental des ressources naturelles océaniques associé à cette méthode d'élevage.

Une gestion durable et responsable de l'alimentation aquacole intensive est essentielle pour préserver les ressources aquatiques et minimiser les effets indirects de l'aquaculture intensive sur les stocks naturels de poissons.

2.2 Profils des extrants d'une production de poissons

2.2.1 Les rejets dissous et particulaires en milieu ouvert

La charge en nutriments dissous ou particulaires des eaux de rejets d'un système aquacole est liée au rythme métabolique de la biomasse élevée. La composition des aliments, leur digestibilité et le taux de

conversion alimentaire conditionnent en grande partie le niveau de dégradation des eaux de rejets. Cet effluent est chargé en matières organiques solides et en nutriments (phosphore et azote) dissous. Ce flux de rejet aquacole peut amener des changements dans les écosystèmes naturels, particulièrement l'eutrophisation des milieux aquatiques. En milieux ouverts (cages ou bassins), l'effluent est relâché dans l'environnement, et sa charge sera liée aux facteurs de concentration de poissons et à la méthode d'alimentation du cheptel. Ainsi, les molécules rejetées restent stockées ou réutilisées par l'environnement. Dans tous les systèmes de production en milieu ouvert, c'est la capacité de l'environnement à diluer/absorber les émissions dissoutes qui va déterminer le seuil de pollution du site d'exploitation. Dans les fleuves pour les productions de type extensif, ou en cage, ce sont le débit d'eau circulant à travers les cages et la charge de poissons qui vont déterminer la concentration des molécules diffusées dans le milieu. Une formule permet d'évaluer l'objectif environnemental des rejets en fonction de la qualité de l'eau en amont de la production et du débit :

Charge tolérable à l'effluent = Charge maximale – Charge amont

(QE x CE) = (QD x critère) - (QAM x CAM) où :

Q représente le débit, C représente la concentration, AM est la localisation amont

Les opposants à l'aquaculture en milieu ouvert citent souvent une étude européenne qui a conclu que la pollution d'une salmoniculture moyenne équivaut aux rejets d'eaux usées d'une ville de plusieurs milliers d'habitants (Martinez-Porchas and Martinez-Cordova, 2012). En milieu ouvert, en addition des rejets issus des poissons, les antibiotiques et autres produits chimiques administrés aux poissons d'élevage peuvent s'écouler directement dans l'eau environnante, et constituent un extrant dont il est difficile d'évaluer l'impact (Manna *et al.*, 2020). Pour les cages, étant donné les densités d'élevages, la maladie peut être considérée, soit comme un intrant si elle est issue de l'environnement, soit comme un extrant du système si c'est une bactériose ou une virose se propageant dans les populations sauvages.

Les poissons excrètent, à travers leurs branchies et le rein, des composés dissous azotés (N) et phosphorés (P), issus du métabolisme oxydatif de l'aliment (Altimiras *et al.*, 2008). La dégradation des protéines entraîne une production d'azote ammoniacal sous forme moléculaire NH_3-NH_4^+ qui correspond à 70-90 % de l'azote dissous chez les poissons de mer (Pagand *et al.*, 2000a). Chez le poisson d'eau douce, qui urine plus abondamment (en lien avec la salinité des fluides et le phénomène d'osmose), les concentrations excrétées sous formes ammoniacales sont plus faibles, mais compensées par l'azote uréique $CO(NH_2)_2$. La forme ammoniacale étant toxique pour le poisson, un élevage extensif doit veiller à maintenir des densités de poissons adéquates afin d'éviter des concentrations ammoniacales délétères pour la croissance ou la survie de l'organisme. Généralement, cette forme est diluée par le débit de la rivière en extensif ou du courant marin en cage. Les principaux rejets phosphorés dissous sont des orthophosphates (PO_4^{3-}) représentant environ 20 % du phosphore ingéré (Dosdat *et al*., 1996). La concentration en phosphore des fèces de poissons est plus importante que l'azote (Franco-Nava *et al.*, 2004). Le carbone non assimilé par le poisson est principalement rejeté sous forme particulaire dans les fèces, alors que la forme de carbone inorganique dissoute dans l'eau (CO_2) est minoritaire.

En résumé, dans un système ouvert de production, les eaux de rejets sont composées principalement d'azote, de phosphore et de carbone. Ces émissions sont souvent diluées dans le débit circulant des courants. Toutefois, dans les pays du Nord dotés d'une législation contraignante, ces flux sont modélisés afin d'établir une autorisation avant l'implantation de fermes de poissons. Les molécules azotées, phosphorées et carbonées peuvent être une source de réutilisation biologique dans le cadre d'une intensification écologique de la filière aquacole.

2.2.2 Rejets dissous et particulaires en milieu recirculé

Les fortes densités de poissons envisagées dans les systèmes intensifs en milieu clos de type RAS soulèvent plusieurs challenges à relever en matière de qualité d'eau. Par définition, le système recirculé a un renouvellement de l'eau neuve, l'eau du circuit étant en traitement. Parmi les molécules de rejets, les formes ammoniacales représentent un risque de toxicité pour le poisson. Dans un circuit recirculé (eau douce / mer), un filtre biologique nitrifiant contenant des bactéries d'eau douce ou d'eau de mer (Blancheton, 2000), ou encore de façon confidentielle des algues (Karya *et al.*, 2013), vont oxyder la forme ammoniacale NH_3-NH_4, et produire en réaction finale une autre forme azotée de type nitrate (NO_3), non toxique pour le poisson. La réaction chimique bactérienne se nomme la nitrification et est composée de deux étapes :

La nitritation (conversion bactérienne du NH_4 toxique en NO_2 aussi toxique pour le poisson)

$$55\ NH_4 + 76\ O_2 + 5\ CO_2 \rightarrow 54\ NO_2 + 109\ H^+ + 55\ H_2O + C_5H_7O_2N$$

La nitratation (conversion du NO_2 toxique et du NO_3 non toxique pour le poisson)

$$400\ NO_2^- + 195\ O_2 + 5\ CO_2 + NH4 \rightarrow 400\ NO_3^- + C_5H_7O_2N + H^+$$

Certains systèmes de production utilisent la réaction de dénitrification consistant à réduire les nitrates produits par la nitrification. Toutefois, les sujets de l'intensification écologique, de l'aquaponie et de la valorisation des effluents aquacoles incitent à étudier l'opportunité d'utiliser cette forme de nitrate comme un fertilisant pour organismes photosynthétiques. La concentration de poissons et le faible renouvellement de l'eau d'élevage n'engendrent pas des concentrations de phosphore pouvant être délétères pour les cheptels de poissons. Le ratio N(totale)/P dans un circuit recirculé dépend fortement de la digestibilité de l'aliment, et sa valeur se situe aux environs de 20 (Mladineo *et al.*, 2010). Comme pour l'azote, la présence de phosphore contribue à réfléchir sur sa valorisation en tant que fertilisant pour une production primaire aquatique ou terrestre.

Les fortes concentrations de dioxyde de carbone (CO_2) dans un circuit recirculé peuvent provoquer une acidification du milieu d'élevage, qui, lors de la filtration du sang par le rein du poisson, entraîne une acidose. Les tubes rénaux tentent de compenser physiologiquement cette acidose : ils forment et séquestrent ainsi sur le rein des dépôts de minéraux de phosphate de calcium provoquant une néphrocalcinose, qui perturbe le comportement et le métabolisme du poisson (Klykken *et al.*, 2022). La contre-mesure pour évacuer le CO_2 émis par le poisson dans la colonne d'eau est l'usage d'une colonne de dégazage qui va séparer le CO_2 de la colonne d'eau. Comme pour l'azote et le phosphore, le CO_2 déjà dissous dans l'eau peut être considéré comme un élément fertilisant valorisable dans le cadre d'une culture photosynthétique aquatique (macroalgues ou microalgues).

Les nutriments N, P, C récupérés peuvent être réutilisés pour l'agriculture ou l'horticulture, plutôt que de se déverser de manière incontrôlable dans l'environnement aquatique, provoquant des proliférations d'algues potentiellement nuisibles ou l'eutrophisation du milieu.

2.3 Des aquacultures durables : une notion de durabilité plurielle

Ainsi, plusieurs systèmes de productions aquacoles différents s'adaptent à la géographie, à la culture locale et à la situation économique du pays. La notion de durabilité des systèmes de productions aquacoles est à considérer pour chaque situation, en prenant en compte le challenge de la sécurité alimentaire de la filière par les pays du Sud, la valorisation des effluents aquacoles, et la réduction de l'impact anthropique de l'activité sur l'environnement.

2.3.1 Une sécurité alimentaire pour les pays à revenus faibles ou intermédiaires

La sécurité alimentaire est assurée lorsqu'une population peut, à tout moment, avoir un accès physique et économique à une alimentation suffisante saine et nutritive, répondant à ses besoins physiologiques et à ses préférences alimentaires. L'aquaculture joue un rôle majeur dans l'apport de protéines de qualité dans l'alimentation des pays à faibles revenus ou intermédiaires (en anglais : LMIC). Les pays à faibles revenus sont définis par un revenu national brut (RNB) inférieur à 1 135 € par habitant (RNB de la France : 36 860 €). Les méthodes de pisciculture de ces régions sont essentiellement tournées vers des systèmes ouverts à faible investissement, pouvant être une retenue d'eau creusée, ou l'usage d'étangs ou de co-cultures en alternance avec des rizières, par exemple. C'est une « économie douce » basée généralement sur un circuit court de consommation, et qui est vitale pour la population locale ou régionale. Les espèces de poissons cultivées sont robustes et résident dans des enceintes rudimentaires.

Dans certains pays à revenus intermédiaires, c'est-à-dire avec un RNB entre 1 135 € et 4 850 € par habitant, le système économique permet quelquefois d'avoir recours à une alimentation de la pisciculture à base d'aliments formulés. On constate aussi des volumes d'exportations d'une partie de la production vers des pays riches ayant une forte demande de protéines et de lipides d'origine aquatique et un déficit de production locale. Ce phénomène d'exportation peut affaiblir la sécurité alimentaire locale, mais en contrepartie rapporte des devises à l'économie du pays concerné (FAO, 2022).

2.3.2 Une préoccupation environnementale pour les pays à infrastructure technologique avancée

À l'exception de quelques producteurs tels que la Norvège, la plupart des pays du Nord importent du poisson d'aquaculture majoritairement élevé en cage (figure 7).

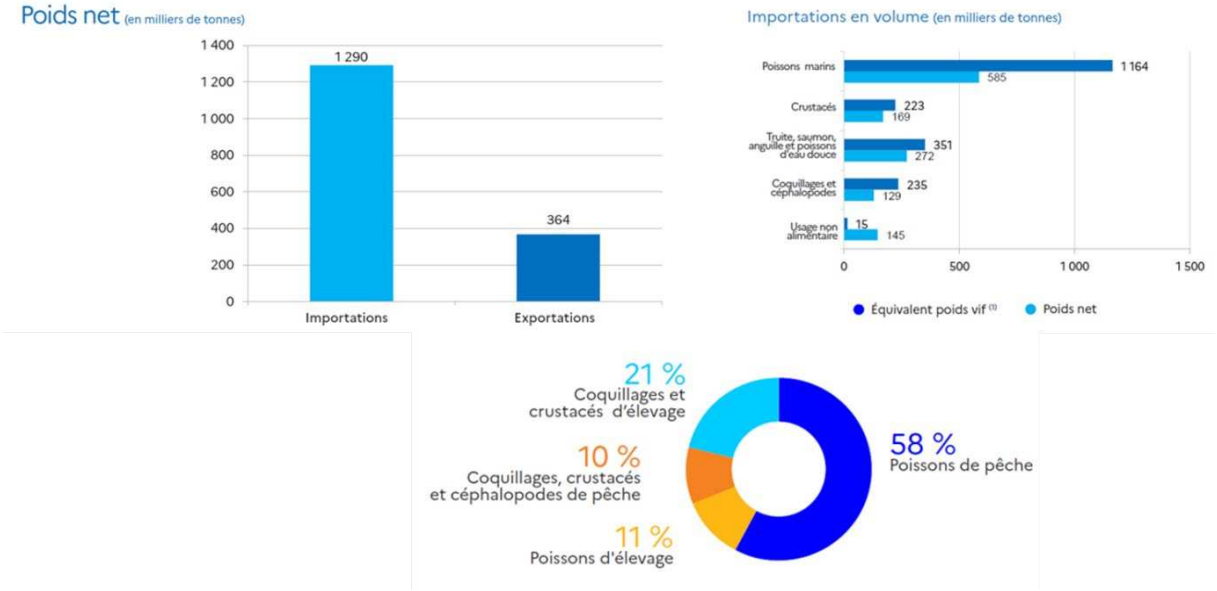


***Figure 7**. Exemple de la France, balance commerciale des échanges de produits aquatiques (pêche et aquaculture), types d'organismes et propositions sur le marché de la consommation (source : FranceAgrimer 2022).*

Les circuits aquacoles recirculés de type RAS sont des conceptions technologiques nécessitant un investissement économique et humain, à la portée des pays ayant accès à un financement (privé ou public) et à l'énergie nécessaire pour la gestion des installations. Le fonctionnement du RAS est basé sur le traitement de l'effluent aquacole d'une boucle primaire de poissons (bassins), avec une réutilisation de l'eau et un contrôle des paramètres abiotiques d'élevage. Actuellement, le RAS couvre 1,5 % à 2 % de la production de poisson d'élevage en Europe (EUFOMA, 2020), et son expansion est entravée par l'opposition de l'opinion publique, le coût élevé de la structure et la maîtrise des solutions technologiques. Malgré cette situation actuelle, de nombreux pays, tels que la Norvège, les États-Unis, le Danemark, le Canada, la Chine, la France, la Suisse, la Corée du Sud et l'Afrique du Sud, ont manifesté un grand intérêt pour l'élevage de saumon en RAS. Pour ces pays, le saumon est une espèce importée à forte valeur ajoutée : c'est donc une considération économique qui prévaut, et non une urgence alimentaire. La conscience environnementale des pays dont l'économie satisfait les besoins vitaux engendre de nouveaux concepts de consommation s'attachant à l'idée d'une production aquacole ayant le moins d'impacts possible sur l'environnement. Le RAS est une solution permettant de s'affranchir des contraintes géographiques et de disponibilité en eau.

Laine *et al.* (2023) proposent une analyse coûts-avantages pour comparer les avantages sociaux et économiques de l'aquaculture de deux salmonidés, dans deux systèmes différents. La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et le corégone européen (*Coregonus lavaretus*) sont élevés en système recirculé (RAS) et comparés à des technologies marines d'élevage en cages. L'évaluation inclut les dommages d'eutrophisation causés par les nutriments et la valorisation économique du poisson produit. Les conclusions montrent que les coûts de production des cultures en cages restent inférieurs à l'investissement dans un RAS. Toutefois, le RAS est basé sur l'idée que la quantité de déchets rejetés dans l'environnement est minimisée, comparée à celle de l'élevage en cage. Or, les préférences des

consommateurs évoluent sur le continent américain, et les consommateurs sont prêts à payer plus cher pour un poisson élevé en RAS, considérant que l'impact sur l'écosystème est fortement réduit. Les auteurs attirent l'attention sur le cadre juridique européen qui tend à légiférer sur la qualité des eaux de rejets de l'activité aquacole. Une mise en place plus drastique de la directive européenne *Water Framework* pourrait avoir pour conséquence la révision de l'évaluation comparative des coûts de production d'un RAS et d'un élevage en cage en faveur du RAS (Söderasp and Pettersson, 2019).

2.4 Vers une aquaculture multitrophique intégrée (AMTI)

Comme tout système de production agricole ou industrielle, l'activité aquacole utilisant une alimentation formulée induit un impact sur la disponibilité des matières premières (poissons de pêche minotière, végétaux terrestres,) et émet dans l'environnement des fractions de rejets dissous et particulaires. La production de poissons augmente à l'échelle mondiale, et se caractérise souvent par des monocultures avec de fortes quantités d'intrants alimentaires, ce qui peut provoquer une modification de l'environnement par eutrophisation. Pour diminuer ces impacts, la production de poissons doit être repensée avec une approche agroécologique, comme l'intensification écologique (Aubin *et al.*, 2019). Parmi ces approches, l'aquaculture multitrophique intégrée, ou AMTI (Chopin et al., 2000; Chopin et al., 2012), combine des espèces aquatiques nourries par l'homme avec des espèces (animales ou végétales) qui sont ajoutées pour absorber les déchets métaboliques afin d'optimiser l'utilisation des intrants alimentaires et de minimiser l'impact environnemental de ces derniers. Ce concept général est basé sur la complémentarité à l'échelle trophique des espèces aquatiques et leurs interactions au sein d'un système ouvert ou clos.

L'objectif premier de ce concept de recyclage biologique (bioremédiation) est donc d'utiliser une succession d'organismes aquatiques (bactéries, microalgues, détritivores) réduisant les concentrations de molécules dissoutes (essentiellement, NH_4, PO_4, CO_2) se trouvant dans les effluents de pisciculture, afin de préserver l'environnement. Le second objectif de cette cascade trophique est de produire des organismes ayant un rôle dans la bioremédiation des matières dissoutes et particulaires qui soit compatible avec l'alimentation du poisson, afin de contribuer à la réduction des prélèvements de petits pélagiques dans nos océans. Pour explorer des combinaisons d'espèces aquacoles, la modélisation des maillons de la chaîne trophique est nécessaire afin d'étudier et de soutenir leur conception (Zhang *et al*., 2016).

2.4.1 Deux exemples d'AMTI en milieu extensif renforçant la sécurité alimentaire

Étant donné la diversité des systèmes agricoles extensifs et des espèces qui les composent, plusieurs combinaisons sont envisageables pour expérimenter des AMTI. Deux exemples sur deux continents dépendant de la sécurité alimentaire illustrent la variabilité des combinaisons du concept d'AMTI.

2.4.1.1 *Riziculture et pisciculture en Asie*

La diminution actuelle des terres cultivables et des réserves en eau douce pousse les populations et les autorités publiques à trouver des techniques qui permettent de rentabiliser au mieux ces deux ressources.

L'association riziculture/aquaculture est une écotechnologie qui joue sur le mutualisme entre l'environnement des rizières et des organismes aquatiques. Cette méthode d'agriculture-pisciculture apporte de nombreux avantages aux populations, tout en réduisant les impacts environnementaux de la pisciculture et de la riziculture classiques. Ainsi, les productions de riz augmentent en moyenne de 10 % grâce à l'apport des nutriments des poissons. Les nuisibles et les vecteurs de maladies du riz voient leur nombre baisser. L'association riz/poissons/azolla permet quasiment d'éradiquer la malaria dans certaines régions (Magnat, 2000).

2.4.1.2 *Une cascade trophique en Afrique de l'Ouest*

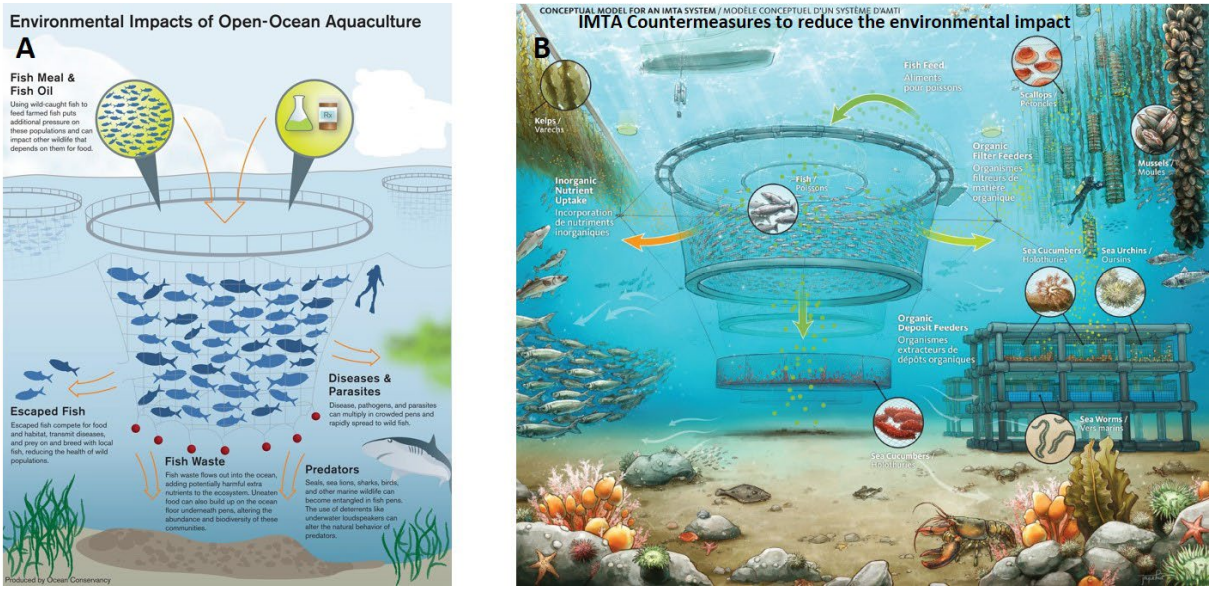
Dans un système aquacole en cascade en eau saumâtre, les effluents de bassins de tilapia *Sarotherodon melanotheron heudelotii* fournissent le carbone inorganique et une source azotée issus de leur métabolisme, pour alimenter l'eau de culture en microalgues *Chlorella sp.* cultivées en bassin ouvert. Les algues jouent un rôle d'absorption de l'azote et du phosphore, et contribuent à l'augmentation de la concentration en oxygène de l'eau. Toutefois, la biomasse algale a une croissance exponentielle, et doit être régulée pour équilibrer l'écosystème artificiel. La *Chlorella sp.* est l'une des sources alimentaires du tilapia. Cependant, le milieu étant ouvert, l'efflorescence algale et la forte densité cellulaire favorisent l'implantation de zooplancton de type rotifère *Brachionus plicatilis*, qui se trouve être aussi une source alimentaire du tilapia. Un total de 87 kg de poissons est produit en 117 jours d'élevage en auto-alimentation avec les organismes du système. Cette expérimentation souligne la complexité à gérer la phase algale du système dans un milieu de type tropical, mais contribue à une avancée notable sur l'étude de faisabilité des cascades trophiques en matière d'épuration et d'apport nutritif endogène au système (Gilles *et al.*, 2013).

2.4.2 L'AMTI en milieu ouvert marin : une contre-mesure à la dispersion des rejets

La plupart des cages à poissons marins sont exploitées comme des systèmes d'enclos en filet traversé par un courant continu. Cela signifie que l'eau traverse les cages, ce qui peut entraîner un gaspillage des intrants alimentaires, ainsi qu'une eau de rejet altérée chargée de nutriments à la fois particulaires (fèces, non-ingéré alimentaire) et dissous (azote ammoniacal, phosphore) dans l'environnement. Fuites de poissons et usages pharmaceutiques sont potentiellement à considérer dans un tel système (figure 8A).

Dans un système aquacole ouvert, des études sur la concentration de chlorophylle a (*chl a*) aux abords des cages en mer ou des rejets de fermes révèlent que la concentration de *chl a* est en dessous de la théorie biologique, en dépit des fortes quantités de nutriments rejetés par ces systèmes. La comparaison des résultats des essais biologiques avec et sans brouteurs a montré que la prédation algale joue un rôle clé dans la régulation de la biomasse phytoplanctonique en mer ouverte, en maintenant la *chl a* à des niveaux très bas aux abords des cages et en transférant efficacement les nutriments absorbés par le phytoplancton vers le haut de la chaîne trophique *via* le zooplancton (Pitta *et al.*, 2009). Ce résultat est aussi constaté dans le chapitre 3, lors des essais de polyculture algale en bassins ouverts. Ainsi, naturellement, une cascade trophique se met en place autour des cages, orientée par les flux de rejets azotés et phosphorés de la biomasse de poissons. Le concept d'aquaculture multitrophique intégrée en milieu ouvert (figure 8B) apporte ainsi des contre-mesures pour réduire les impacts sur la qualité de l'eau (Chopin *et al.*, 2012). Par exemple, une culture de macroalgues de type Kelp proche des cages capte une partie des émissions issues des poissons pour ses propres croissances (Reid *et al.*, 2013). La

concentration résiduelle contribue à un développement de microalgues de souches locales, qui sont à leur tour consommées par des organismes filtreurs de types pétoncles, moules ou huîtres. Les particules organiques décantables du type excréments de poissons ou aliments non ingérés ont des propriétés nutritionnelles pour des organismes marins détritivores tels que les oursins ou les concombres de mer (Chary et al., 2020; Sadoul et al., 2022), qui peuvent être maintenus dans des enceintes secondaires sous les cages. Un écosystème benthique spécifique (bactérien, vers et autres) se met alors en place pour une dégradation secondaire contribuant à l'équilibre de l'écosystème.



***Figures 8**. (A) Impacts environnementaux potentiels d'une cage en mer ouverte (©open Ocean). (B) Contre-mesures proposées par l'intégration de plusieurs organismes, par niveaux trophiques, autour des cages pour réduire l'impact environnemental (©Fisheries and Oceans Canada).*

Il existe des avantages à intégrer des bivalves et des macroalgues dans les fermes piscicoles. Les bivalves et les macroalgues élevés relativement près des cages à poissons (1 m pour les macroalgues et 60 m pour les mollusques) ont montré une production de biomasse significativement plus élevée par rapport aux témoins élevés à plus de distance. Ces informations montrent que la production accrue d'espèces extractives (algues, mollusques) est généralement plus élevée au contact des cages à poissons, cela étant probablement en lien avec le facteur de dilution des nutriments, qui est proportionnel à l'éloignement du site d'émission (Kerrigan and Suckling, 2018).

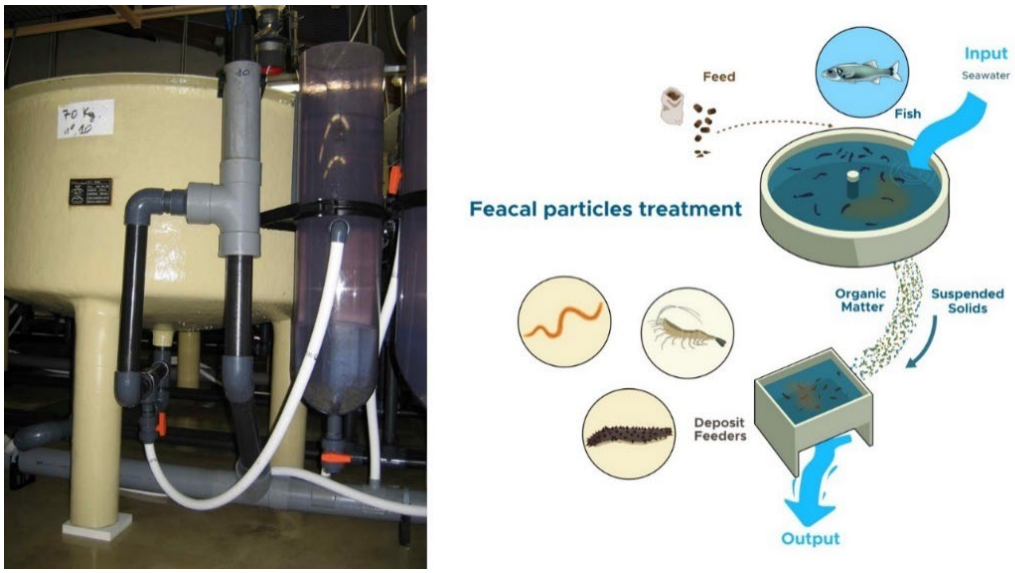
Ainsi, deux types d'organismes associés au dispositif AMTI en mer ouverte sont présents sur le site d'élevage de poissons. Des organismes types s'y développent : ceux avec une valeur marchande et pouvant être extraits et valorisés, tels que les macroalgues cultivées, les holothuries ou les mollusques ; ceux qui font partie de l'équilibre de l'écosystème naturel secondaire soutenu par l'apport de nutriments organiques ou inorganiques (microalgues, bactéries). En outre, les organismes non commercialisés jouent un rôle écosystémique en fonction de la spécificité du site (biotique et abiotique) et des limites opérationnelles (éloignement de la côte). L'objectif est d'augmenter la durabilité de l'écosystème exploité et sa rentabilité à long terme par unité de culture (Troell *et al.*, 2009).

2.4.3 Une AMTI intégrée aux systèmes RAS : objectif zéro rejet

Dans les pays à l'économie soutenue, la conception des boucles AMTI en bassins est basée sur un élevage de poissons en RAS. L'objectif en est de réduire drastiquement les rejets de la filière en valorisant les effluents d'une pisciculture intensive. La production en RAS implique donc une alimentation aquacole formulée procurant un excellent indice de conversion et une production de poissons avec un cycle d'extraction rapide. De fait, si l'effluent de rejets est limité, il reste néanmoins très concentré en matières dissoutes azotées et phosphorées. La particularité du RAS est aussi de pouvoir compartimenter l'ensemble des maillons des procédés biologiques, capturer et concentrer les diverses formes de rejets solides ou liquides, et les réorienter vers des compartiments dédiés à leur valorisation.

2.4.3.1 *Bioconversion des matières particulaires d'une AMTI*

Les matières particulaires sont essentiellement composées d'excréments de poissons, qui constituent une source de carbone et de phosphore (Franco-Nava *et al.*, 2004). Les rejets particulaires sont collectés à l'aide de pièges à particules (figure 9A). Le volume des fèces dépend du nombre de repas proposés à la population de poissons, de la concentration de poissons, de l'indice de conversion et du stade de vie. L'étude du polychète aquatique *Hediste diversicolor* nourri sur excréments de poissons et sur granulés aquacoles a montré la capacité du ver marin à convertir les deux sources de déchets en biomasse (figure 9B). Ces supports alimentaires permettent d'envisager l'élevage d'un cycle de vie complet de cette espèce de ver marin. Des reproductions de vers ont pu être observées durant les 98 jours d'expérimentation (Galasso *et al.*, 2020). Les vers procèdent à la bioconversion des protéines fécales (environ 15 % de la matière sèche) et des acides gras non digérés. L'analyse zootechnique de la production de vers sur fèces de poissons a montré un excellent indice de conversion (Elissen *et al.*, 2015). En parallèle, plusieurs études soulignent la qualité nutritionnelle des vers détritivores pour une formulation alimentaire aquacole (Shafique et al., 2021; Wang et al., 2019). Ces recherches sont prometteuses pour développer un compartiment spécifique dans une AMTI convertissant les excréments de poissons en source alimentaire directe (nourrissage en proies vivantes) ou indirecte (farines de vers).



***Figures 9**. (A) Dispositif de collecte d'excréments de poissons en système RAS (©Przybyla). (B) Bioconversion des déchets particulaires organiques d'élevage de poissons par une culture de détritivores dont les vers aquatiques (©Bardelli).*

2.4.3.2 *Bioconversion de la matière dissoute en organismes photosynthétiques*

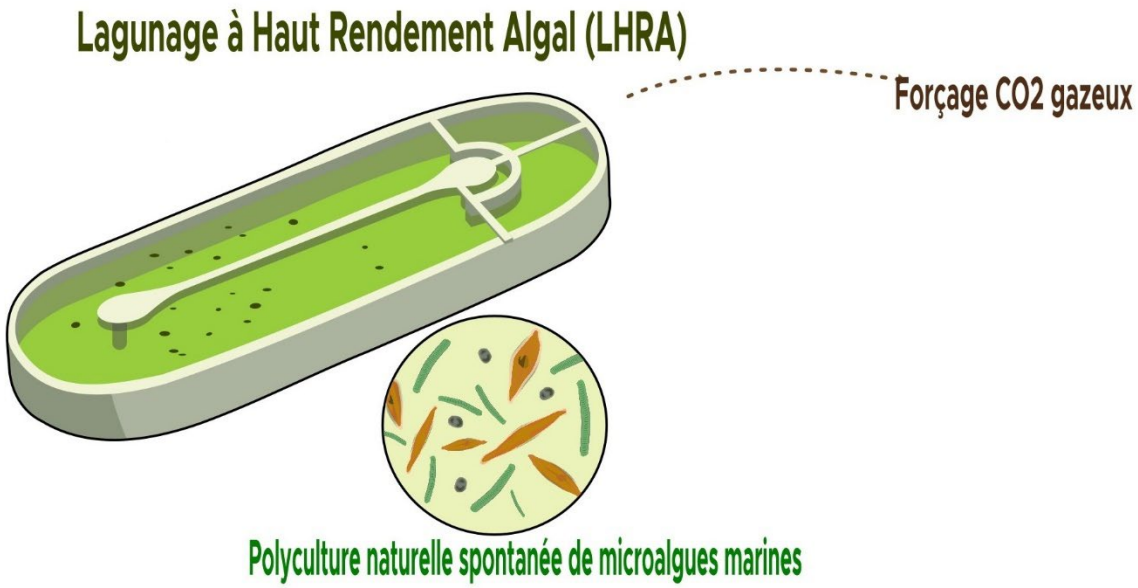
Comme évoqué précédemment, un système RAS nécessite un apport d'eau neuve minime, et le traitement bactérien du filtre biologique permet de réduire les concentrations toxiques de NH_4 issues du métabolisme des poissons (Blancheton *et al.*, 2013). La forme ammoniacale est convertie en nitrate dont la concentration augmente au fil du temps, lorsque la biomasse de poisson est alimentée. L'ensemble des molécules de nitrates et de phosphates constitue des fertilisants potentiels pour une culture d'organismes photosynthétiques. Les premiers usages de systèmes d'épuration en aquaculture en milieu contrôlé consistaient à utiliser des macroalgues telles que *Ulva rigida*, pour réduire la charge de nutriments en sortie de ferme de production. L'étude de cas de la ferme marine de Douhet conduite par Roblin (2019) révèle que le rejet journalier sur un site de production de daurades, bars et maigres est de 22,4 kg d'azote total dissous. Environ 11 tonnes d'ulves (matière sèche à 4,5 % d'azote) sont produites en lagunage en sortie de pisciculture sur 6 000 m^2. La biomasse algale transformée en paillettes puis vendue sur un marché cosmétique ou pharmaceutique (polysaccharides de type ulvanes) constitue une source de revenu supplémentaire. L'AMTI en mer ouverte ou en milieu clos et contrôlé est donc une approche pratique d'épuration d'eau qui propose une perspective de revenus agricoles supplémentaires. Avec le même flux d'eau disponible pour l'élevage de poissons, ce n'est plus une monoculture qui est proposée, mais une polyculture d'organismes aquatiques de niveau trophique plus bas valorisant les nutriments et les particules émis par la production primaire de poissons.

3 UNE APPROCHE PAR COMPARTIMENT

Un système de production aquacole en cascade trophique est un puzzle d'écosystèmes dont le fonctionnement biologique doit être décrit et maîtrisé individuellement avant assemblage.

Les travaux qui suivent s'inscrivent dans le contexte d'une recherche en aquaculture marine intensive, et plus particulièrement dans des cultures d'organismes potentiellement pertinentes pour être associées à une boucle primaire de production de poissons de type RAS. C'est une approche dite écosystémique.

Parmi les maillons composant l'AMTI adossés à un circuit recirculé, les cultures photosynthétiques de microalgues peuvent jouer le rôle d'épuration biologique de nutriments dans les eaux de rejets. Avant d'intégrer et boucler ce maillon au RAS, il est donc nécessaire de bien connaître le fonctionnement du compartiment algal lui-même, en matière de maintien de culture, de croissance, et d'interaction avec l'environnement (Gales *et al.*, 2020).



Gales, A., Triplet, S., Geoffroy, T., Roques, C., Carre, C., Le Floc'h, E., Lanfranchi, M., Simier, M., d'Orbcastel, E.R., **Przybyla, C**.& Fouilland, E., 2020.

Control of the pH for marine microalgae polycultures: A key point for CO2 fixation improvement in intensive cultures. Journal of Co2 Utilization. 38, 187-193**.**

3.1 Comprendre et contrôler une polyculture de microalgues marines en lagunage à haut rendement algal : l'exemple de la régulation par le CO_2

3.1.1 Introduction

La microalgue est un organisme incontournable lorsqu'il s'agit de valoriser des effluents liquides ou gazeux issus d'une activité anthropique (Guo et al., 2015; Olaizola, 2003; Wang et al., 2008; Yang, 2011; Yun et al., 1997). Grâce à la photosynthèse, les microalgues peuvent convertir le CO_2 d'origine industrielle jusqu'au carbone inorganique émis par la respiration des élevages de poissons. La biomasse produite issue de l'épuration algale pourrait être utilisable comme source de matière première pour la cosmétique, l'énergie, mais elle pourrait aussi constituer une source alternative de matière première pour l'alimentation aquacole (voir chapitre 4). Dans le milieu naturel, une augmentation du niveau de CO_2 dissous dans les océans engendre une acidification pouvant avoir des conséquences sur la croissance des organismes planctoniques marins (Hassoun e*t al.*, 2015).

L'injection d'importantes quantités de CO_2 gazeux dans une culture expérimentale d'algues en milieu contrôlé acidifie la colonne d'eau et modifie l'équilibre des carbonates dans l'eau (Yang, 2011). Une injection contrôlée de CO_2 optimise l'activité métabolique des espèces d'algues et leur croissance à condition d'avoir des niveaux de fertilisation azotée et phosphorée non limitants. En milieu contrôlé, l'augmentation de la concentration du carbone inorganique (jusqu'à 5 %) peut contribuer à l'amélioration de l'absorption de la lumière et de son utilisation par les microalgues, ce qui a pour conséquence l'augmentation de la biomasse de la culture de microalgues (Sutherland et al., 2016; Sutherland et al., 2015). La microalgue marine *Nannochloris sp.* cultivée en photobioréacteur atteint un taux de croissance maximal à pH 6, une teneur maximale en carbone à pH 7 (Vasseur *et al.*, 2012). Autre exemple de diversité physiologique chez les microalgues, la croissance optimale de la cyanobactérie *Spirulina platensis* et de l'algue verte *Chlorococcum littorale* est à pH 9 et pH 4 respectivement (Zeng *et al.*, 2011). Chez le rotifère, l'un des prédateurs des microalgues, la variation du pH associée à l'injection de CO_2 gazeux affecte négativement la densité de sa population (Montemezzani *et al.*, 2017).

La culture à grande échelle de microalgues marines semble être l'une des approches les plus prometteuses pour produire des sources durables de nourriture, riches en lipides et en protéines d'origine marine (Greene *et al.*, 2016). La production de masse microalgale devient envisageable dès lors qu'elle est réalisée sur de grandes surfaces à l'extérieur (à l'opposé des productions en photobioréacteur, limitées en surfaces et en volumes d'eau). Le contact avec l'environnement naturel favorise le développement de polycultures algales spontanées dont l'ensemencement naturel dépend du site géographique, de la météo et de la biodiversité locale. Les performances de croissance sont plus élevées dans une polyculture naturelle de microalgues (figure 10) que dans une polyculture de monosouches assemblées. Cette observation suggère que les consortia naturels développent une meilleure complémentarité dans les niches d'absorption des nutriments et les rendements associés (Thomas *et al.*, 2019).

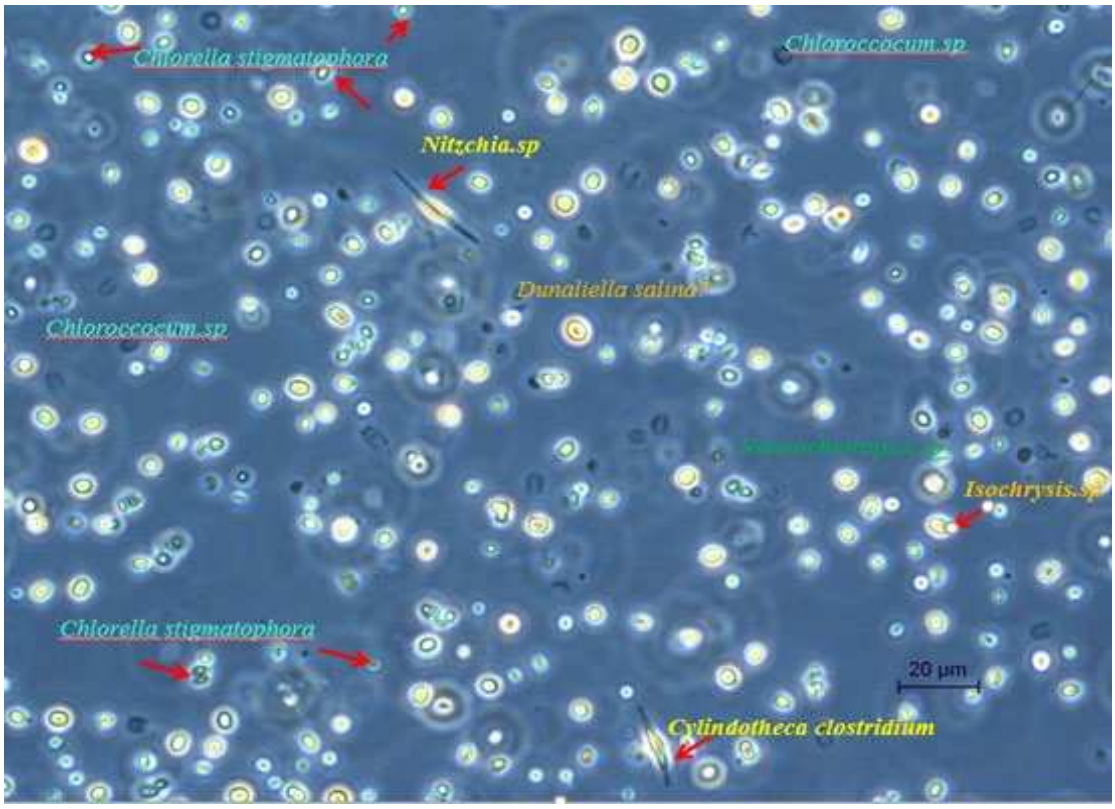


***Figure 10**. Polyculture naturelle et spontanée de microalgues marines, développée en bassin de culture à haut rendement algal à Palavas-les-Flots en 2016.*

Ainsi, ce système de culture d'efflorescence spontanée d'un consortium algal naturel en plein air révèle des avantages en matière de maintien de culture, car les souches d'algues sont naturellement adaptées à la saison, au lieu géographique et au milieu de culture (température / salinité). L'expérimentateur ou le producteur ne produisent pas d'efforts pour maintenir une souche non adaptée à l'environnement de culture. Toutefois, chaque lieu géographique produit des successions d'assemblages de souches spécifiques à son environnement, et cette étude a pour objectif de mesurer la diversité algale, l'absorption photosynthétique du CO_2 injecté, l'accumulation de biomasse carbonée, ainsi que le développement associé de prédateurs d'algues sous trois valeurs de pH en dessous de celui de l'eau de mer (8.2), en vue de déterminer l'optimum de croissance du consortium naturel. Cette étude propose des courbes d'efficacité de conversion du CO_2 en fonction du pH. L'ensemble des résultats permettra d'évaluer les performances de croissance optimale de la biomasse du consortium naturel, car celle-ci est directement liée à la capacité d'absorption des nutriments dans le cadre d'une AMTI.

3.1.2 Matériels & méthodes

Les expérimentations se sont déroulées à la station Ifremer de Palavas-les-Flots, Hérault, France, au printemps et au début de l'été 2016, pour coïncider avec la période climatique de croissance algale la plus favorable. La première série de tests a eu lieu du 17 mai au 22 juin (36 jours), et la seconde série du 27 juin au 26 juillet (29 jours).

Pour chaque essai, trois lagunages à haut rendement algal (LHRA) de 10 m^3 et 4,5 m^2 ont été suivis simultanément, sur deux périodes d'une trentaine de jours, avec des injections de CO_2 régulées. Les pH ont été maintenus à 6, 7 et 8, respectivement (figure 11), par injection de CO_2 dans le volume d'eau des

lagunes artificielles, afin d'évaluer à quelle condition d'acidité la polyculture naturelle exprimait la plus forte croissance, et par conséquent la meilleure capacité de stockage du carbone inorganique.

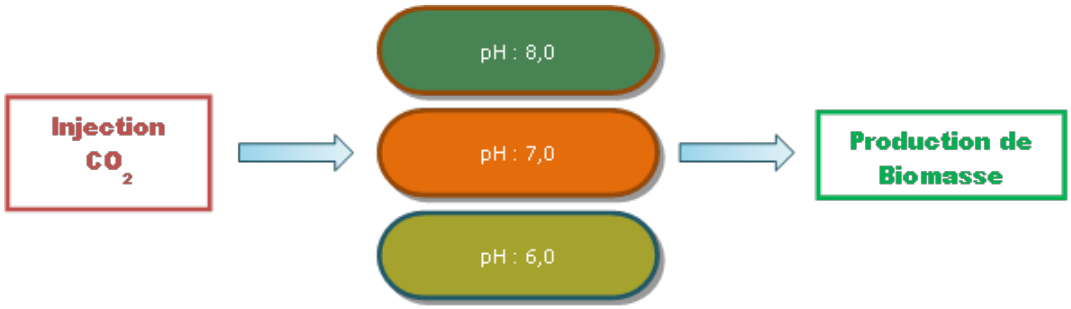


***Figure 11**. Schéma de principe des deux séries d'expérimentations en lagunage à haut rendement algal pour l'évaluation de la production de la biomasse en fonction du pH.*

Pour toutes les expériences, l'eau de mer a été pompée en mer, puis filtrée à 100 µm et enrichie en source de phosphore (phosphate) et azote (ammonium et nitrate) à hauteur de 5 mg L^{-1} et 80 mg L^{-1} respectivement. L'ensemencement du consortium de microalgues marines s'est effectué naturellement dans les LHRA (figure 12).

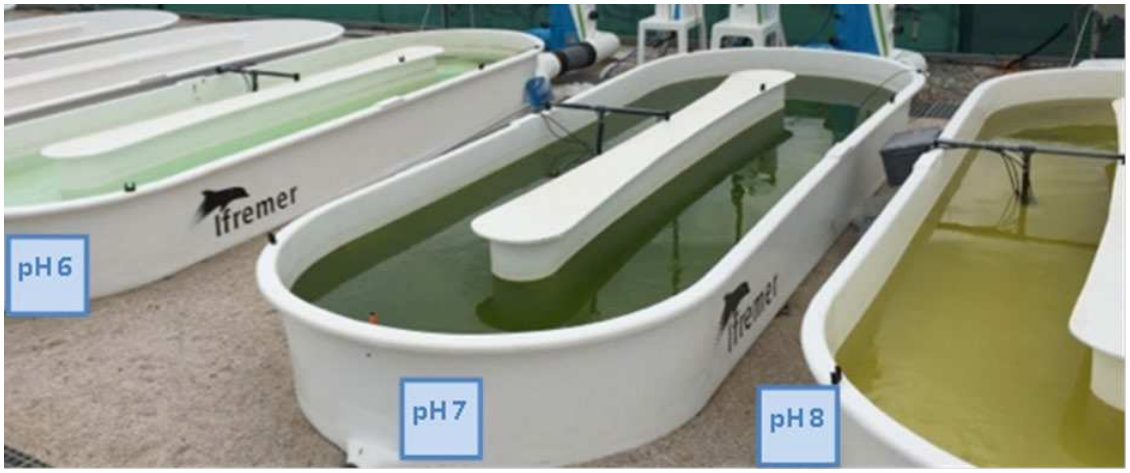


***Figure 12**. Efflorescence spontanée de microalgues marines en consortium naturel de la série 1 après 15 jours de culture.*

Un dosage de la chlorophylle a selon la méthode de (Ritchie, 2006) a été réalisé quotidiennement avec l'objectif de suivre de manière précise l'évolution de la biomasse algale au cours du temps. Entre 3 et 800 ml d'échantillons (selon la densité algale) ont été filtrés sur des filtres GF/F de 13 mm pour déterminer les concentrations totales de *chl a*.

Des mesures de carbone organique particulaire (POC) ont été effectuées hebdomadairement sur les cultures. Entre 5 et 100 mL d'échantillons ont été filtrés sur des filtres Whatman GF et analysés à l'aide d'un spectromètre de masse ANCA (Europa Scientific). En raison du petit volume d'échantillons (< 100 mL), nous avons supposé que les microalgues étaient principalement collectées et retenues sur le filtre (taille nominale des pores de 0,7 µm). En parallèle, la mesure POC révélait la concentration de la biomasse carbonée de microalgues.

La structure de la communauté microalgale a été déterminée dans toutes les lagunes expérimentales au début (Jour 0) et à la fin de chaque essai expérimental (Jour 36 et Jour 29) en utilisant la méthode d'analyse du gène ARNr 18S. Les mesures physicochimiques de l'eau (température, salinité, oxygène, CO_2) ont été relevées tous les jours au même point de prélèvement de chaque LHRA.

L'absorption photosynthétique de CO_2 par les microalgues dans les LHRA a été calculée en utilisant les données de la production de biomasse et de la production d'oxygène. Des échantillons de polyculture naturelle ont été prélevés en flacons en polycarbonate de 30 mL, et placés dans une chambre à température contrôlée sur mesure de photosynthèse avec un gradient d'intensité lumineuse allant jusqu'à 400 µmol $m^{-2}s^{-1}$ en utilisant un réseau de LED blanches de 4 watts. L'oxygène dissous (pour déterminer la photosynthèse nette) a été mesuré toutes les 20 minutes pendant 6 heures d'incubation dans tous les flacons éclairés. Le taux de photosynthèse net a été calculé à toutes les intensités lumineuses. Les échantillons ont également été incubés dans l'obscurité à la même température afin de déterminer les niveaux et les fréquences respiratoires, ainsi que la consommation d'oxygène durant cette phase. Les taux photosynthétiques bruts pour toutes les intensités lumineuses ont été calculés comme la somme des taux nets de photosynthèse et de rythmes respiratoires.

3.1.3 Résultats et discussion

Dans les LHRA pH-6, le pH était en moyenne de 6,2 $\pm$ 0,2. Une variabilité a été enregistrée dans les LHRA pH-7 où le pH moyen était de 6,7 $\pm$ 0,1 et 7,0 $\pm$ 0,1 lors des cycles 1 et 2, respectivement. Dans les LHRA pH-8, le pH était en moyenne de 8,2 $\pm$ 0,1 et 7,9 $\pm$ 0,1 pendant les cycles 1 et 2, respectivement. Le profil des mesures est présenté en figure 13.

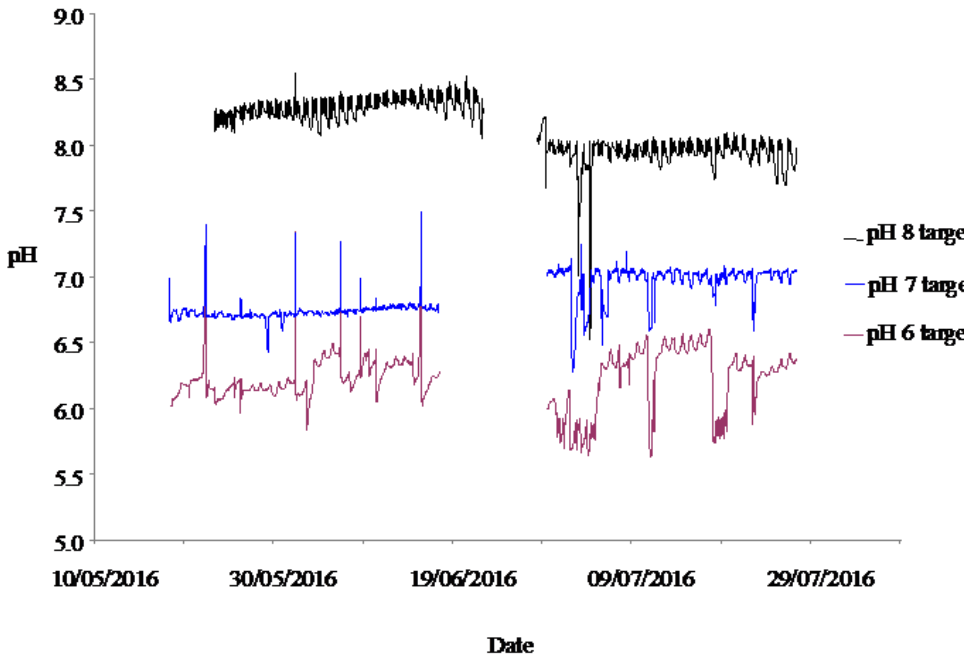


***Figure 13**. Synthèse des enregistrements de valeurs de pH en fonction des valeurs cibles maintenues par injection de CO_2 pur dans la polyculture des LHRA expérimentaux.*

3.1.3.1 *Diversité algale en fonction du pH*

Le résultat de diversité montre la présence de microalgues vertes et de diatomées dans le consortium naturel spontané (figure 14).

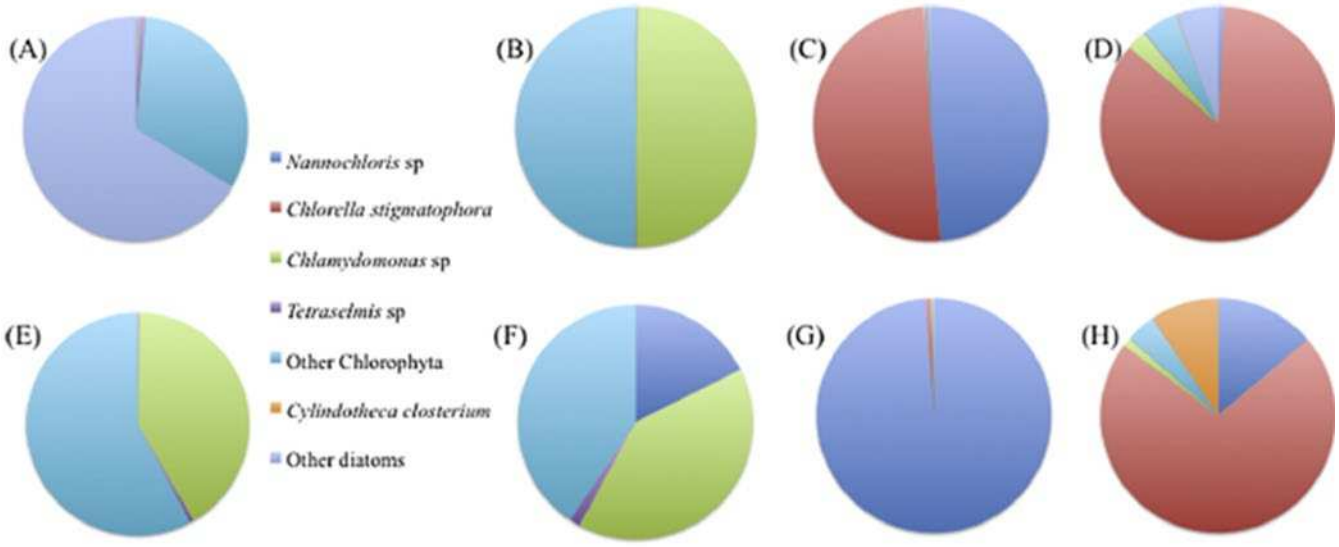


***Figure 14**. La diversité des microalgues a été déterminée à l'aide de l'analyse du gène de l'ARNr 18S. La première expérience s'est déroulée du 17 mai au 22 juin 2016 (A-D). Organismes identifiés en début d'expérience (A) et ceux identifiés en fin d'expérience dans des LHRA à pH 6 (B), pH 7 (C) et pH 8 (D). La deuxième expérience s'est déroulée du 27 juin au 26 juillet 2016 (E-H). Organismes identifiés au début de l'expérience (E) et à la fin de l'expérience dans les LHRA à pH 6 (F), pH 7 (G) et pH 8 (H).*

La croissance des plus grosses microalgues (> 5 µm), comme *Chlamydomonas sp*., était favorisée à pH 6, tandis que des microalgues plus petites (< 2 µm), comme *Nannochloris sp*. et *Chlorella stigmatophora*, ont atteint des taux de croissance maximaux à pH 7 et pH 8, respectivement (figure 15). Ces deux dernières espèces ont déjà été signalées comme étant très résistantes aux variations environnementales, et se développant dans des eaux marines polluées (Brayner et al., 2011; Cho et al., 2007).

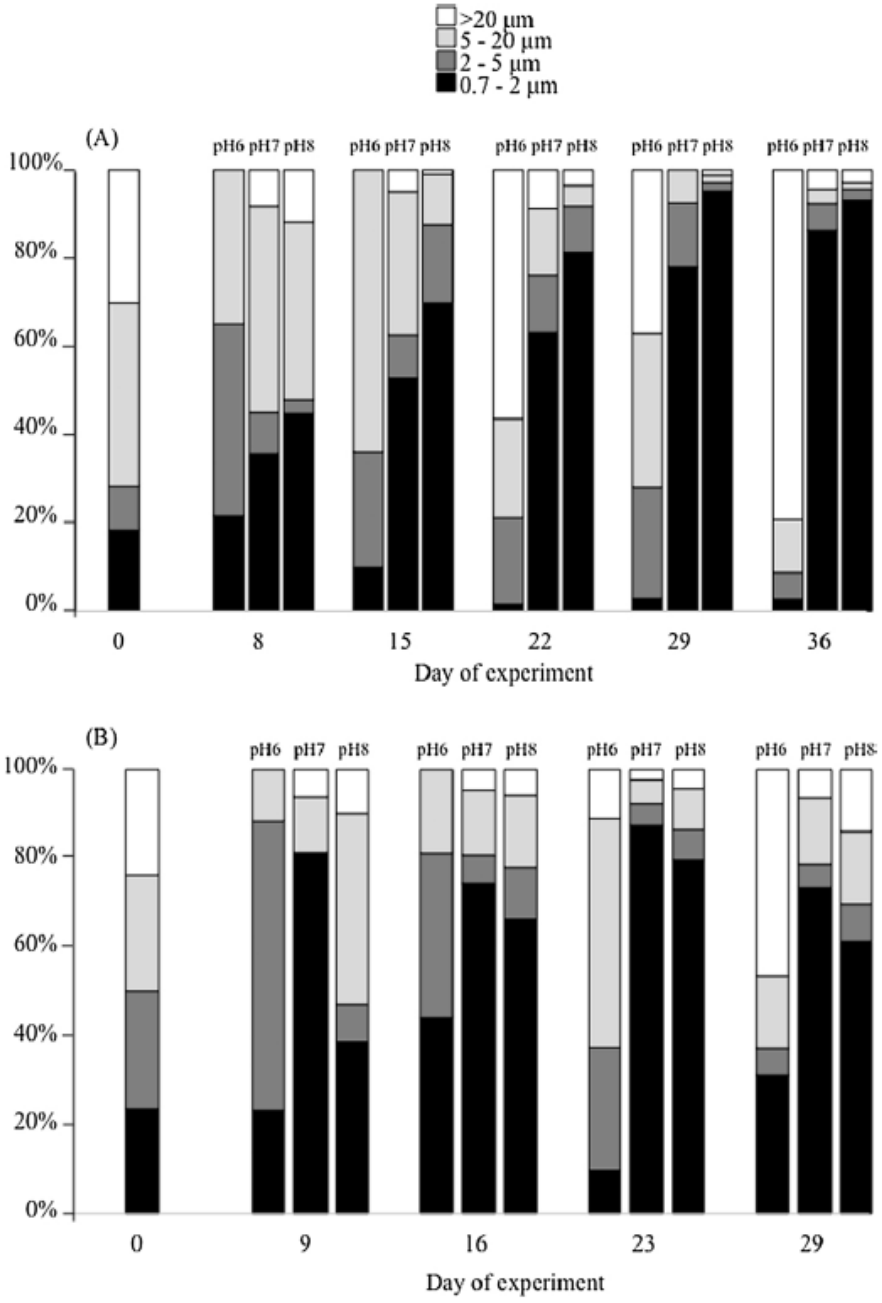


***Figure 15**. Fractions de taille de la biomasse algale (mesures* chl a*) mesurées dans les LHRA à pH 6, pH 7 et pH 8 lors du premier essai expérimental (A) et du deuxième essai expérimental (B).*

Les résultats suggèrent que le niveau de CO_2 pour contrôler le pH oriente la structure de l'assemblage d'espèces de microalgues en milieu ouvert. Bien que des différences dans la diversité des microalgues aient été observées dans les LHRA, aucune différence significative n'est apparue sur les paramètres photosynthétiques. Cependant, l'effet photo-inhibiteur était significativement plus élevé dans les LHRA à pH 7 et pH 8.

3.1.3.2 *Diversité des prédateurs en fonction du pH*

Un fort développement de rhizopodes de la famille des amibes a été observé dans le LHRA à pH 6 (tableau 1). Les amibes rhizopodes sont connues pour se nourrir de matière organique, de bactéries et de petites cellules d'algues (Carney and Lane, 2014). Elles ont aussi des taux de croissance plus élevés à un pH inférieur à celui de l'eau de mer (Rodríguez-Zaragoza, 1994). Le pH semble donc avoir un impact direct sur la présence de prédateurs d'algues. Un pH bas a un effet négatif sur les ciliés et les copépodes, mais un effet positif sur la présence d'amibes. En conséquence, de faibles niveaux d'accumulation de microalgues ont été observés à pH 6.

Le développement du réseau trophique marin typique (ciliés, rotifères, copépodes) a été observé dans les lagunes à pH 8, conduisant à la dominance de très petites cellules d'algues. Au pH intermédiaire de 7, l'abondance des prédateurs était le plus bas, et l'accumulation de la biomasse de microalgues a été affectée par la structure initiale de la communauté des prédateurs et la température. En effet, un niveau plus faible d'accumulation de biomasse algale a été observé dans LHRA à pH 7 pendant la série 2 lorsque la présence initiale d'amibes et la température de l'eau (> 25° C) étaient significativement plus élevées.

***Tableau 1**. Abondance de tous les principaux groupes de protozoaires et de métazoaires identifiés par microscopie dans le LHRA à pH 6, pH 7 et pH 8 au début et à la fin des deux essais expérimentaux de l'étude.*

Size fraction	Group (ind. L^{-1})	20th of May 2016 (T0)	22rd of June 2016 (Tf)			28th of June 2016 (T0)	26th of July 2016 (Tf)		
			pH 6	pH 7	pH 8		pH 6	pH 7	pH 8
35-100 µm	Free ciliates		208	312	3952	103	3328	1664	34320
	Attached ciliates	52	3432	832	120016			1040	43888
	Rhizopods		18408	624	1040	11	57928	8008	1352
	Actinopods				416		1976	416	208
	Nematods	10	520	936	416		104	2184	
	Rotifers								520
	Copepods			1664	104			312	2600
> 100 µm	Nematods larvae	9	104		351	5	50	513	169
	Tisbe sp.			299	156				871
	Tisbe nauplius	0							104
	Copepod nauplii			59					

3.1.3.3 *Croissance algale en fonction du pH*

La plus forte accumulation de carbone sous forme de biomasse algale (> 150 mg L^{-1}) a été observée dans les LHRA à pH 8. Les valeurs les plus basses (< 50 mg L^{-1}) ont été observées dans les LHRA à pH 6 (figure 16). De façon intéressante, la biomasse algale dans les LHRA au pH intermédiaire 7 enregistre un profil différent de courbe de croissance sur l'essai 2, ce qui n'est pas le cas des pH 6 et 8, qui sont homogènes sur l'ensemble des tests. Dans toutes les conditions de pH, une biomasse algale plus faible a été observée au cours de l'essai 2. La température de l'eau était plus élevée en juillet (moyenne de 25,3 °C) qu'en juin (moyenne de 21,8 °C). La quantité de prédateurs sur toutes les conditions était plus importante dans l'essai 2 (en juillet), entraînant une augmentation de la pression de prédation sur la biomasse des polycultures microalgales, impactant négativement la croissance globale.

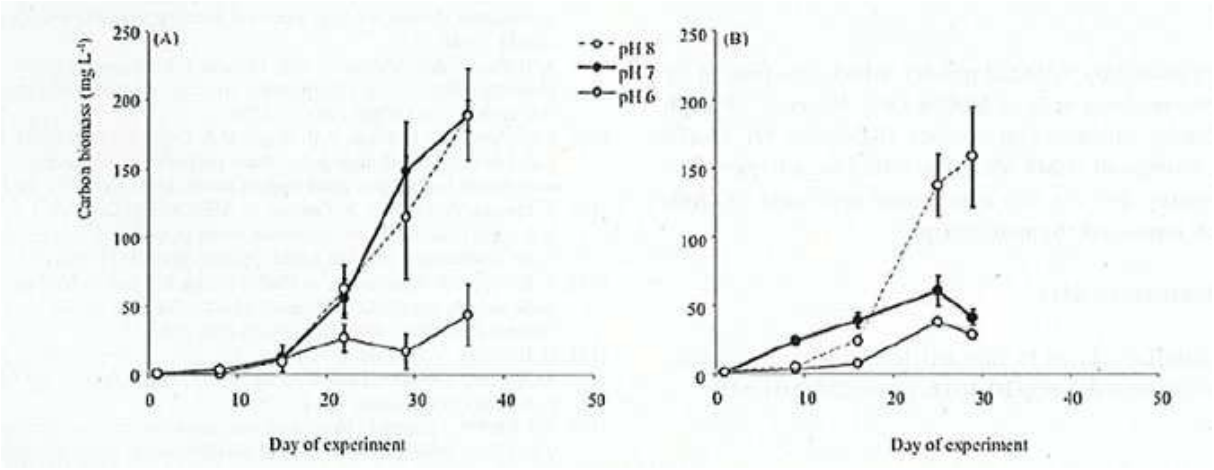


Figure 16. *Concentration de la biomasse carbonée mesurée dans les LHRA (moyenne et écart-type des triples échantillons) lors du run 1 du 17 mai au 22 juin 2016 (A), et lors du run 2 du 27 juin au 26 juillet 2016 (B).*

3.1.4 Conclusions

Les résultats montrent que le LHRA à pH 7, contrôlé par addition de CO_2 gazeux, a favorisé la croissance de *Nannochloris sp*. et réduit les populations de prédateurs d'algues marines. À la différence des microalgues, les organismes zooplanctoniques ont un processus respiratoire qui combine l'oxygène pour produire de l'énergie en libérant du CO_2 et d'autres métabolites. Sur un plan physiologique, on peut supposer qu'à l'équilibre des gaz dissous dans la colonne d'eau, l'augmentation de la concentration de CO_2 pour atteindre des pH inférieurs à celui de l'eau de mer en condition naturelle (pH 8,2) réduit la disponibilité en oxygène pour les prédateurs brouteurs, limitant ainsi la reproduction de ces populations zooplanctoniques. Le gradient d'acidité de l'eau de culture favorise le développement d'amibes et limite, par effet de prédation, la croissance de la culture d'algues.

Cette première étude engendre des pistes expérimentales visant à évaluer un mode de gestion d'une culture de microalgues marines en consortium en utilisant le paramètre d'acidité de la culture ou la concentration d'un CO_2 dissous. Ces travaux constituent une connaissance de base pour alimenter les futures études sur les supports de vie biorégénératifs (BLSS) des modules spatiaux, notamment sur la fermeture totale d'un système de traitement des gaz en utilisant une production algale (figure 17). À ce jour, les recherches sur la capacité épuratoire des algues dans le cadre d'un BLSS spatial se concentrent sur des cultures monosouches (Fahrion et al., 2021; Yang et al., 2019b). Une polyculture en consortium en milieu clos et contrôlé, où chaque souche algale joue un rôle épuratoire de niche, semble être une piste prometteuse pour développer des systèmes de traitement de gaz (CO_2) ou de liquides (sanitaires et autres).

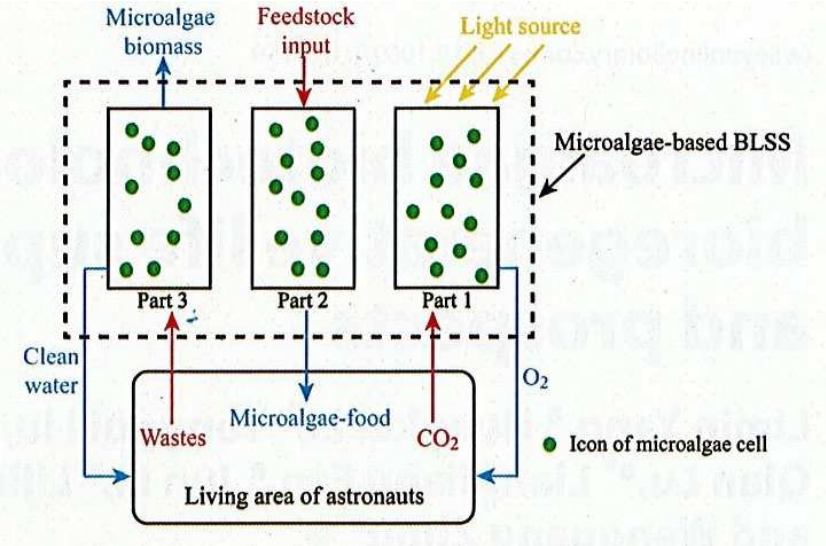


***Figure 17**. Principe des cultures d'algues associées à un système de support de vie biorégénératif dans l'espace. Extrait de Yang* et al. *(2019b).*

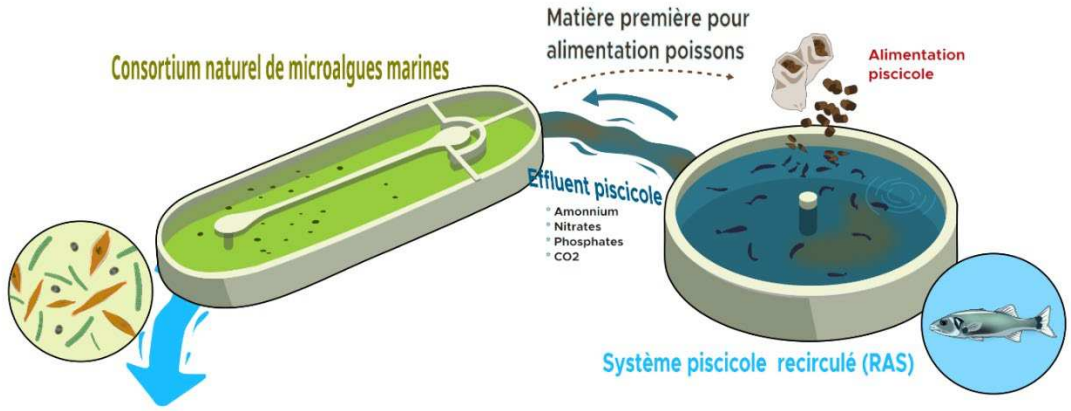
4 UNE APPROCHE EN CASCADE TROPHIQUE

La boucle primaire de production de poisson en circuit recirculé (RAS) est généralement bien décrite et maîtrisée à l'échelle industrielle, même si certains axes de recherche contribuent à améliorer le système en apportant de la connaissance sur l'optimisation des techniques, la diversification des espèces élevées, ou la réduction de la consommation énergétique.

Les autres maillons d'une AMTI, tels que le compartiment de traitement algal des matières dissoutes ou la dégradation des déchets organiques par des détritivores, sont quant à eux en phase d'étude (Galasso et al., 2020; Granada et al., 2018). L'association de ces compartiments biologiques est décrite dans le milieu naturel, notamment autour des cages (Chary *et al.*, 2020). Les premières initiatives de cascades trophiques en RAS (poisson/algues/mollusques) annoncent un futur prometteur.

L'aquaculture intensive moderne fait appel à une alimentation formulée, dont une partie de sources protéiques et d'acides gras polyinsaturés (AGPI) proviennent des pêcheries minotières. Il était pertinent de se demander si dans le cadre d'une AMTI, la polyculture de microalgues marines étudiée au chapitre 3, ayant une fonction de bioremédiation des effluents aquacoles, pouvait aussi jouer le rôle de source alternative de matière première pour la formulation de granulés piscicoles. De plus, la gestion d'une culture de microalgues bioremédiatrices en croissance continue demande que le système soit régulièrement soulagé d'une partie de sa biomasse algale afin de maintenir sa capacité épuratoire (Deviller *et al.*, 2004).

Ce chapitre va prospecter l'opportunité de valoriser les effluents d'un circuit recirculé d'une population de bars en farine algale pouvant être réintégrée dans l'aliment du poisson à un niveau d'incorporation proposant les mêmes performances de croissance qu'un granulé moderne commercial (Pascon *et al.*, 2021). L'enjeu en est de soulager les prélèvements, en milieu naturel, de petits pélagiques destinés à la production de farines de poissons sauvages rentrant dans la formulation de l'aliment aquacole, et de promouvoir une production circulaire.



Pascon, G., Messina, M., Petit, L., Valente, L.M.P., Oliveira, B., **Przybyla, C**., Dutto, G., Tulli, F., 2021.

Potential application and beneficial effects of a marine microalgal biomass produced in a high-rate algal pond (HRAP) in diets of European sea bass, Dicentrarchus labrax. Environmental Science and Pollution Research.

4.1 Effet bénéfique de l'inclusion d'une polyculture de microalgues marines épuratrices d'effluents aquacoles dans l'alimentation de microalgues marines du bar européen (*Dicentrarchus labrax*)

4.1.1 Introduction

L'utilisation potentielle de microalgues comme ingrédient pour les aliments aquacoles pourrait représenter une alternative écologiquement attractive non seulement face aux ingrédients traditionnels d'origine marine et végétale (Becker, 2007), mais aussi face aux autres ingrédients innovants tels que les insectes, les algues et les levures. Leurs valeurs nutritionnelles sont reconnues (Spolaore *et al*., 2006), ainsi que leurs usages en tant que compléments alimentaires dans le secteur médical ou celui de la nutrition humaine (Priyadarshani and Rath, 2012), grâce aux propriétés fonctionnelles de leurs pigments et à leurs composés bioactifs. De plus, leur composition peut être élevée en protéines (30 à 70 %), et en lipides (10 à 20 %) contenant des acides gras essentiels (Becker, 2007). Les applications dans l'alimentation de l'aquaculture moderne émergent depuis quelques années. Récemment, Castro *et al.* (2020) ont montré que l'inclusion de 15 % de *Nannochloropsis sp*. dans le régime alimentaire du bar européen a un effet antioxydant sur le foie et les intestins. De plus, la *Nannochloropsis oculata* alimentaire améliore significativement les paramètres de croissance et la résistance des agents pathogènes *Aeromonas veronii* chez le tilapia du Nil (Abdelghany *et al.*, 2020).

Les essais d'inclusion de microalgues dans l'aliment aquacole ont jusqu'à ce jour été conduits avec des souches cultivées en monoculture en photobioréacteurs axéniques (Cardinaletti et al., 2018; Kiron et al., 2012; Tibaldi et al., 2015; Tulli et al., 2012; Vizcaíno et al., 2016). Plusieurs procédés à l'échelle pilote ou industrielle sont désormais basés sur les cultures de microalgues non axéniques issues du traitement des eaux usées. Des études récentes ont prouvé que la biomasse de microalgues et leur composition lipidique peuvent être ajustées dans des conditions de stress physiologique, avec des privations d'azote ou des variations de la salinité associées à un choc thermique (Anitha et al., 2018; Markou et al., 2016). On parle ici d'« orientation métabolique de culture algale ».

Une culture de microalgues dans un système de bassin algal à haut débit (LHRA), telle que décrite au chapitre 3, est un moyen simple et économique de produire de la biomasse en valorisant des effluents agricoles ou d'aquaculture (Deviller *et al.*, 2004). En pisciculture, ce dispositif peut être associé à une boucle de traitement secondaire permettant la réutilisation de l'eau tout en fournissant des nutriments fertilisants pour la production de biomasse algale (Craggs et al., 2014; Metaxa et al., 2006; Pagand et al., 2000b). Une étude a démontré que l'eau des effluents de pisciculture de bar, assainie par des microalgues marines, puis renvoyée dans les bassins de poissons, ne présentait pas de risques pour la croissance des populations de poissons. De plus, ce système de réutilisation de l'eau n'engendre pas plus de parasitose de monogènes de type *Diplectanum sp.* dans les branchies qu'un circuit sécurisé de type RAS (Mladineo *et al.*, 2010). Ainsi, le traitement de l'eau par des microalgues pourrait être associé à la production d'une source de protéines, de lipides riches en oméga-3, d'antioxydants et d'ingrédients naturels destinés à la formulation d'aliments aquacoles formulés.

Sur la base de ce constat, cette étude a pour objectif d'évaluer les effets de l'inclusion d'une farine de consortium naturel de microalgues marines cultivées dans un système LHRA sur les performances zootechniques, les indices morphométriques, la digestibilité des nutriments alimentaires, ainsi que sur la morphologie et la fonctionnalité du système digestif du bar européen à travers l'activité enzymatique, afin

de comparer l'efficacité alimentaire de l'inclusion du consortium de microalgues cultivées en polyculture naturelle. Une condition alimentaire composée de *Nannochloropsis sp*. cultivée en monoculture en photobioréacteur sera aussi étudiée selon le même protocole.

4.1.2 Matériels & méthodes

La polyculture expérimentale

Un consortium naturel de microalgues marines a été cultivé dans un raceway de type LHRA (140 m^2 et 60 m^3), sous un rayonnement naturel et orienté par la météo locale, à l'automne 2017, en France, sur la côte occidentale de la Méditerranée (43° 31' 59.98" N, 3° 55' 59.99" E). Le raceway a été initialement rempli d'eau de mer naturelle filtrée à 30 µm, et alimenté avec un profil d'effluent correspondant à l'élevage du bar européen (*Dicentrarchus labrax*) fournissant 80 g N/jour et 30 g P/jour. Ce rejet correspond à un RAS contenant 2 200 poissons de 100 g. La méthode de culture utilisée est identique à celle décrite dans le chapitre 3, avec une injection de CO_2 afin de maintenir un pH 7 permettant de limiter le développement de zooplanctons brouteurs.

La productivité de la culture calculée sur la période d'échantillonnage était de 2,53 g/m^2/jour.

La biomasse de consortium de microalgues a été concentrée, centrifugée, séchée et broyée chaque semaine pendant deux mois et demi, jusqu'à atteindre 5 kg de farine sèche, et transformée dans une granulométrie identique à celle de la farine de poisson.

L'aliment expérimental

Quatre régimes iso-protéiques (48,5 % $\pm 0,8$) et iso-lipidiques (18,3%$\pm 0,5$) ont été produits sous forme de granulés expérimentaux (tableau 2).

Comme régime témoin (CTRL), une formulation a été spécialement formulée afin d'imiter un aliment commercial aux caractéristiques identiques contenant des farines, des huiles et des protéines d'origine végétale, dont farine de soja, concentrés de protéines de pois, et semoule de blé.

L'inclusion du consortium de microalgues a partiellement remplacé les protéines d'origine du régime témoin à hauteur de 10 % (MC10) et de 20 % (MC20). Afin de comparer les effets de la farine de polyculture avec une culture monosouche, un régime expérimental a été formulé incluant 10 % d'une farine commerciale de *Nannochloropsis sp*. (N10).

Pour évaluer la digestibilité des formulations, nous avons utilisé la méthode indirecte, consistant en l'analyse des concentrations d'un marqueur inerte (l'oxyde d'yttrium, Y203) dans les aliments et dans les fèces. L'oxyde d'yttrium a été choisi, car il a l'avantage d'être non toxique et non assimilable. Tous les aliments expérimentaux sont marqués à l'oxyde d'yttrium (20 mg/100 g d'aliment), et la digestibilité est connue par la différence entre les concentrations de l'aliment et celles des fèces du poisson.

***Tableau 2**. Ingrédients (g/100 g) et composition proximale, teneur en phosphore et en énergie des régimes testés et de l'aliment commercial (CTRL).*

	CTRL	MC10	MC20	N10
Ingredients				
Fishmeal Chile Prime	25.25	25.25	25.25	25.25
Vegetable mix§	37.87	35.05	34.03	36.02
Wheat gluten meal	4.04	5.05	5.05	0.00
Wheat meal	17.17	9.09	0.00	14.74
Fish Oil	13.94	13.73	13.73	12.12
Microalgal *consortium*	0.00	10.10	20.20	0.00
***Nannochloropsis* sp.**	0.00	0.00	0.00	10.10
Min. & Vit. supplement $	1.0	1.0	1.0	1.0
Yttrium oxide	0.02	0.02	0.02	0.02
Binder	0.20	0.20	0.20	0.20
L-methionine	0.50	0.50	0.50	0.50
Chemical composition				
Dry Matter (%)	96.94	96.87	97.17	97.12
Protein (% DM)	49.17	49.26	47.61	48.24
Lipids (% DM)	18.14	17.84	18.18	19.12
Ash (% DM)	7.84	12.80	18.33	10.29
Phosphorus (% DM)	1.03	1.07	1.11	1.13
Gross Energy (MJ/kg)	23.1	22.2	21.2	22.8

Les poissons expérimentaux et les essais de nutrition

L'expérimentation a étudié 636 bars européens (poids corporel initial moyen 18,0 $\pm$ 0,28 g) répartis en 12 bassins de 1 m^3 (53 poissons par bassin), bouclés en circuit recirculé de type RAS. Les paramètres de l'eau d'élevage pendant les 75 jours d'expérimentation sont présentés dans le tableau 3.

***Tableau 3**. Valeurs moyennes et extrêmes des paramètres physico-chimiques de l'eau d'élevage en RAS.*

Parameter	Average	Min.	Max.
Temperature (°C)	22.8	19.7	23.2
Salinity (g/L)	35.3	27.8	39.1
Temperature (°C)	22.8	19.7	23.2
pH	7.1	6.5	7.6
Dissolved Oxygen (mg/L)	7.6	5.6	6.7
$N\text{-}NH_3$ (ppm)	0.3	0.1	0.8
$N\text{-}NO_2$ (ppm)	0.0	0.0	0.0
$N\text{-}NO_3$ (ppm)	1.4	0.4	3.3
$P\text{-}PO_4$ (ppm)	0.1	0.0	0.2

Chaque régime était testé en triplicatas de bassins, et les poissons ont été nourris trois fois par jour jusqu'à satiété. Tous les poissons ont été pesés individuellement toutes les 4 semaines, après un jeûne de 40 heures afin de pratiquer une légère anesthésie par balnéation.

Ces données ont contribué à déterminer :

La prise alimentaire relative :

RFI= apport alimentaire / [(poids corporel initial + poids corporel final)] × 0,5 × jours)

Le taux de croissance spécifique :

SGR= 100 × (ln (poids corporel final − ln (poids corporel initial)) / jours)

Le taux de conversion alimentaire :

FCR = apport alimentaire/gain de poids)

Le ratio d'efficacité protéique :

PER= gain de poids/apport protéique

La rétention protéique :

GPR= 100 × [(teneur finale en protéines corporelles - teneur en protéines) /apport en protéines])

À la fin de l'essai d'alimentation, après 40 heures de jeûne, 3 poissons par bassin (9 par traitement alimentaire) ont été analysés. Les poids et longueur individuels, les viscères, le foie et le poids de graisse ont été enregistrés. Le tractus intestinal a été excisé afin de procéder à une étude histologique et de l'activité enzymatique.

Évaluation de la digestibilité

Pour évaluer la digestibilité des différents régimes marqués à l'oxyde d'yttrium, les excréments de poissons ont été collectés quotidiennement pendant trois semaines, dans les pièges à particules de chaque bassin. L'évaluation de la concentration d'oxyde d'Yttrium résiduel a été réalisé sur des échantillons de fécès séchés.

Le coefficient apparent de digestibilité (ADC) de la matière sèche, les protéines, les lipides et l'énergie des régimes ont été calculés selon la formule suivante :

$$\text{ADC} = 1 - \left[\left(\frac{F}{D}\right) * \left(\frac{Di}{Fi}\right)\right]$$

où

D = % du nutriment ou kJ/g de l'énergie dans le régime ; F = % du nutriment ou kJ/g de l'énergie dans les matières fécales ; Di = % yttrium dans le régime ; et Fi = % Y yttrium dans les matières fécales (Cho *et al.*, 1982).

Histologie intestinale

Six poissons par traitement alimentaire ont été utilisés pour les analyses histologiques. L'intestin de poisson a été disséqué, et des échantillons d'intestin proximal ont été prélevés après le caeca pylorique (fragment de 0,5 cm). Les échantillons ont été fixés sur chaque section intestinale, et les paramètres suivants ont été mesurés dans deux sections de chaque échantillon : aire de la section transversale ; épaisseur de la musculeuse externe (couches musculaires circulaires internes et longitudinales externes), longueur et largeur des plis et présence de cellules caliciformes, comme décrit précédemment. La musculeuse externe a été mesurée en huit points de chaque coupe transversale, et la valeur moyenne a été considérée ; les huit plis les plus hauts de chaque section ont été sélectionnés pour que leur longueur et leur largeur soient mesurées (figure 18).

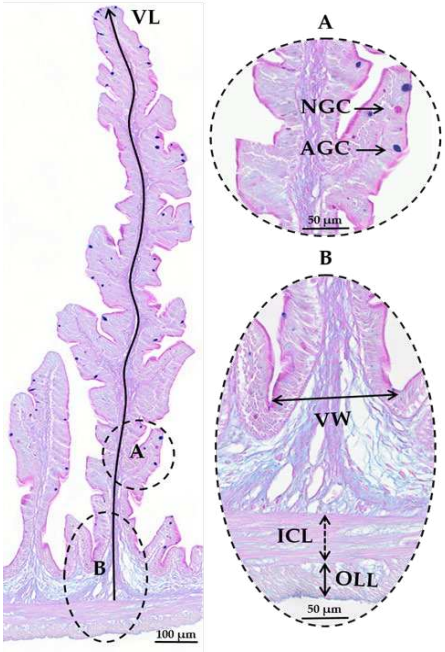


***Figure 18**. Coupes histologiques de l'intestin antérieur (coloration bleu alcian / PAS, pH = 2,5) de bar européen. Longueur des villosités (VL), musculeuse externe (couche longitudinale externe OLL et couche circulaire interne ICL) ; largeur des villosités (VW), cellules caliciformes (AGC acide et NGC neutre).*

Activité des enzymes de la membrane de la bordure en brosse (BBM)

Le tube digestif a été prélevé et divisé en caeca pylorique (PC), intestin proximal (P, section sous le tube avec PC jusqu'à l'augmentation de diamètre indiquant le début de l'intestin distal) et intestin distal (D, la partie terminale de l'intestin de plus grand diamètre, jusqu'à l'anus).

L'extraction des enzymes et l'analyse de la maltase, de la sucrase-isomaltase, de la γ-glutamyl transpeptidase (γ-GT) et de la phosphatase alcaline (ALP) ont été réalisés avec le protocole utilisé par Messina *et al.* (2019). Une unité (U) d'activité enzymatique correspondait à la quantité d'enzymes qui transforme ou hydrolyse 1 µmole de substrat mL-1 min-1. L'activité enzymatique spécifique a été calculée comme U = µm/min/mg de protéine surnageante pour la maltase et la sucrase-isomaltase, et mU pour l'ALP et la γ-GT.

Analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyenne ± écart type. Les données zootechniques et de digestibilité ont été analysées par ANOVA à un facteur pour tester la signification statistique au sein du facteur principal. Les données d'activité enzymatique ont été analysées par un test ANOVA à deux voies, en considérant le traitement diététique et la section intestinale comme facteurs principaux. Le cas échéant, le test de Duncan a été appliqué à un niveau significatif de 95 %. Le progiciel statistique IBM-SPSS (version 17.0) a été utilisé pour effectuer l'analyse des données.

4.1.3 Résultats et discussion

Caractérisation du consortium marin

La caractérisation biomoléculaire du consortium a démontré la présence de 34 formes d'organismes aquatiques dont 6 espèces d'algues dominantes (tableau 4). Les principales espèces du consortium naturel étaient : *Oocystis sp., Chlorella stigmatophora, Tetraselmis sp.* Selon le cycle de culture en étang ouvert et la saison, *Isochrysis sp.* et *Phaeodactylum tricornutum* ont été observés en minorité.

***Tableau 4**. Concentration potentielle en acides gras d'intérêt pour les souches du consortium algal cultivé sur un profil d'effluent de pisciculture. Travail bibliographique.*

	Quantity (%)	Properties	Reference
ALGAE			
Oocystis sp.	80.32	high EPA	Anthony and Stuart 2015
Tetraselmis sp.	6.06	high EPA and ARA	Vizcaíno et al. 2016
Chlorella stigmatophora	2.06	high EPA	Anthony and Stuart 2015
Chlamydomonas sp.	1.22	mineral (boric acid and calcium)	Kliphuis et al. 2012
Nannochloropsis gaditana	0.06	15% max EPA	Anthony and Stuart 2015
Nannochloris sp.	0.06	35% max EPA	Anthony and Stuart 2015
Others			
Rotifera	5.84	Monounsaturated fatty acid	Awaiss et al. 1992
Lacrymariidae (ciliated)	2.09	x	
Cinerochilidae (phylasterides)	2.07	x	
Chytridiomycotina (mushrooms)	0.18	x	
Strombidiidae (ciliated)	0.02	x	

La composition chimique de la biomasse séchée du consortium est présentée dans le tableau 5. Le consortium contient 2,8 % d'azote et 3,2 % de lipides totaux, qui sont des concentrations faibles comparées à la farine de poisson ou à d'autres sources algales. Les acides oléique (16,8 % des acides gras) et linolénique (12,4 % des acides gras) étaient les principaux acides gras. La fraction d'acides aminés libres était dominée par la proline, l'alanine, l'arginine et le glutamate. Le sodium, le fer et le bore sont les plus abondants dans la fraction minérale.

***Tableau 5**. Composition biochimique de la farine du consortium algal cultivé sur un profil d'effluent piscicole.*

Nitrogen (%)	2.8	*Amino acids (nmol/mg)*	Free	Hydrolysed	*Minerals (µg/g)*		*Carbohydrates (%)*	
Lipid (%)	3.2	Arginine	16	66	B	55.1	Galactose	1.9
Gross Energy (kJ/g)	9	Histidine	0	15	Ca	6.4	Glucose	6.6
Fatty acids (% FAMEs)		Lysine	3	47	Cd	0.4	Mannose	2.2
18:1 n-9	16.8	Threonine	1.6	50	Co	2.9	Xylose	1.9
16:3 n-3	4.3	Isoleucine	1	40	Cr	1.1	Fucose	<0.5
16:4n-3	1.9	Leucine	1	40	Cu	5.2	Rhamnose	7.5
18:3n-3	12.4	Valine	2	64	Fe	84.8	Gluconic acid	1.2
20:3n-3	1.1	Methionine	1	14	K	10.4		
20:4n-3	1.1	Phenylalanine	1	37	Mg	16.7		
20:5n-3	9.1	Tryptophan	0	0	Mn	9.6		
22:5n-3	0.2	Alanine	21.3	111	Na	120.5		
SFA	24	Tyrosine	1	20	Ni	0.3		
MUFA	32	Aspartate	1.2	82	P	5.23		
PUFA	42	Glutamate	16.5	92	Zn	7.96		
n-3	33	Glycine	4.3	101				
n-6	8	Serine	3.3	51				
		Proline	42	88				

Performances de croissance des poissons

Pendant la période expérimentale, les poissons ont ingéré facilement les différentes formulations expérimentales, démontrant que l'inclusion de 20 % à 10 % de farine de microalgues cultivées en monoculture en photobioréacteur ou en polyculture naturelle n'altère pas la palatabilité de l'aliment.

Les performances de croissance, RFI, FCR et PER des juvéniles de bars européens nourris avec les régimes expérimentaux pendant 75 jours sont présentées dans le tableau 6.

***Tableau 6**. Performances zootechniques du bar européen en fonction de la qualité des aliments expérimentaux.*

	CTRL	MC10	MC20	N10	P value
Mortality (%)	1	0	1	0	
Initial body weight (g)	18.0 ± 1.1	18.5 ± 0.9	18.5 ± 1.2	18.4 ± 1.0	0.088
RFI[1] (g/kg ABW/ day)	16.7 ± 0.6 b	17.4 ± 0.1 ab	18.4 ± 0.3 a	17.3 ± 0.3 ab	0.018
Final body weight (g)	61.0 ± 11.0 b	64.9 ± 13.4 a	63.4 ± 12.8 ab	63.7 ± 12.7 ab	0.024
SGR[2] (%)	1.65 ± 0.02	1.70 ± 0.01	1.66 ± 0.03	1.68 ± 0.02	0.066
FCR[3]	1.15 ± 0.03 b	1.16 ± 0.01 b	1.25 ± 0.03 a	1.16 ± 0.03 b	0.005
PER[4] (%)	1.82 ± 0.04 a	1.80 ± 0.02 ab	1.73 ± 0.04 b	1.84 ± 0.05 a	0.007
GPR[5] (%)	32.09 ± 1.75	31.33 ± 0.87	30.05 ± 1.76	29.10 ± 1.28	0.075

1 RFI Relative Feed Intake 2 SGR Specific Growth Rate 3 FCR Feed Conversion Ratio 4 PER Protein Efficiency Ratio

5 GPR Gross Protein Retention

Les poissons nourris au régime MC10 (consortium 10 %) présentaient un poids corporel final moyen significativement plus élevé que les poissons nourris au régime témoin, sans que le SGR soit significativement différent des autres conditions.

Les poissons nourris avec le régime CTRL présentaient la consommation alimentaire relative moyenne la plus faible (16,7 g/kg de poissons/j), suivis par ceux nourris avec le régime N10 (17,3 g/kg de poissons/j) et le régime MC10 (17,4 g/kg de poissons/j), tandis que les poissons nourris avec le régime MC20 (consortium 20 %) présentaient la consommation alimentaire relative la plus élevée (18,4 g/kg de poissons/j) ($P < 0,05$). Le régime alimentaire MC20 a entraîné une augmentation significative des valeurs de FCR sur 75 jours par rapport aux autres traitements diététiques (1,25 contre 1,15 respectivement, $P = 0,0052$). Le PER, mais pas le GPR, a été significativement affecté par les régimes expérimentaux. Les poissons nourris avec le régime alimentaire MC20 présentaient une valeur significativement plus faible par rapport au régime CTRL et *Nannochloropsis sp.* (1,73 contre 1,83, $P < 0,05$). Les valeurs des indices biométriques morphométriques calculées à la fin de l'essai chez le bar européen n'ont pas révélé d'effets significatifs dus aux régimes expérimentaux (tableau 7).

***Tableau 7**. Indices biométriques après 75 jours d'expérimentation avec les aliments expérimentaux.*

Biometric index	**CTRL**	**MC10**	**MC20**	**N10**	**P value**
K[1]	1.72 ± 0.11	1.73 ± 0.11	1.70 ± 0.10	1.73 ± 0.12	0.108
HSI[2] (%)	1.18 ± 0.31	1.03 ± 0.27	1.02 ± 0.28	1.27 ± 0.70	0.539
VSI[2] (%)	10.0 ± 1.2	9.54 ± 1.0	9.64 ± 1.9	11.0 ± 1.9	0.162
MFI[2] (%)	5.93 ± 1.12	5.18 ± 0.90	4.85 ± 1.13	5.77 ± 2.13	0.344
Carcass Yield[2] (%)	82.89 ± 2.28	84.26 ± 1.90	83.75 ± 2.29	81.19 ± 3.76	0.101

[1] *K (Fulton's Condition Index)* $= \frac{\text{body weight}}{\text{std lenght}^3}$ [2] *HSI, VSI, MFI, Carcass Yield* $= 100 \text{ x} \frac{\text{weight of liver, viscera, mesenteric fat, carcass}}{\text{body weight}}$

Digestibilité de l'alimentation

Les coefficients apparents de digestibilité en matière sèche, en protéines, en lipides et en énergie des régimes expérimentaux sont présentés dans le tableau 8. Le régime N10 aboutit à des valeurs d'ADC similaires à celles observées dans le régime CTRL de référence (74,28 %, 92,28 %, 85,48 % et 85,8 %, respectivement pour la matière sèche, les protéines, les lipides et l'énergie). Au contraire, l'augmentation de l'inclusion alimentaire du consortium marin a entraîné une diminution significative de la matière sèche, des protéines, des lipides et de l'énergie ADC, comme observé dans MC10 (65,98 %, 90,08 %, 82,88 %, 80,1 % respectivement) et MC20 (57,78 %, 85,28 %, 84,98 %, 75,2 % respectivement, $P < 0,05$).

***Tableau 8**. Coefficients de digestibilité apparente des nutriments et de l'énergie (%) des régimes expérimentaux.*

	CTRL	MC10	MC20	N10	P value
Dry Matter	76.7 ± 1.0 a	65.9 ± 2.0 bc	57.7 ± 6.2 c	74.2 ± 1.1 ab	0.000
Protein	92.7 ± 0.3 a	90.0 ± 0.5 b	85.2 ± 1.2 c	92.2 ± 0.1 a	0.000
Lipid	86.8 ± 0.2 a	82.8 ± 0.8 b	84.9 ± 2.3 ab	85.4 ± 0.3 ab	0.023
Energy	87.4 ± 0.9 a	80.1 ± 1.3 b	75.2 ± 3.4 c	85.8 ± 0.8 a	0.000

Morphologie de l'intestin

Les poissons nourris avec les régimes expérimentaux n'ont pas présenté d'altérations de la morphologie intestinale. La plupart des traits considérés ne variaient pas significativement entre les traitements diététiques ($P > 0,05$), et l'intestin de tous les poissons échantillonnés a montré une morphologie bien conservée, malgré une inclusion entre 10 % et 20 % d'une source microalgale. Une importante réduction du nombre total de cellules caliciformes acides par pli a été enregistrée dans le poisson nourri avec le consortium MC20 par rapport à ceux nourris avec l'aliment CTRL.

L'activité enzymatique de la membrane de la bordure intestinale

L'activité de la maltase, de la sucrase (SI), du γ-GT et de l'alkaline phosphatase (ALP) varie en fonction sur les voies intestinales (figure 19). Le caecum pylorique est le principal site d'activité pour toutes les enzymes étudiées. Le régime contenant 10 % de *Nannochloropsis sp*. a entraîné une diminution importante de l'activité maltase par rapport au régime témoin (3,83 contre 6,41 U, $P < 0,05$).

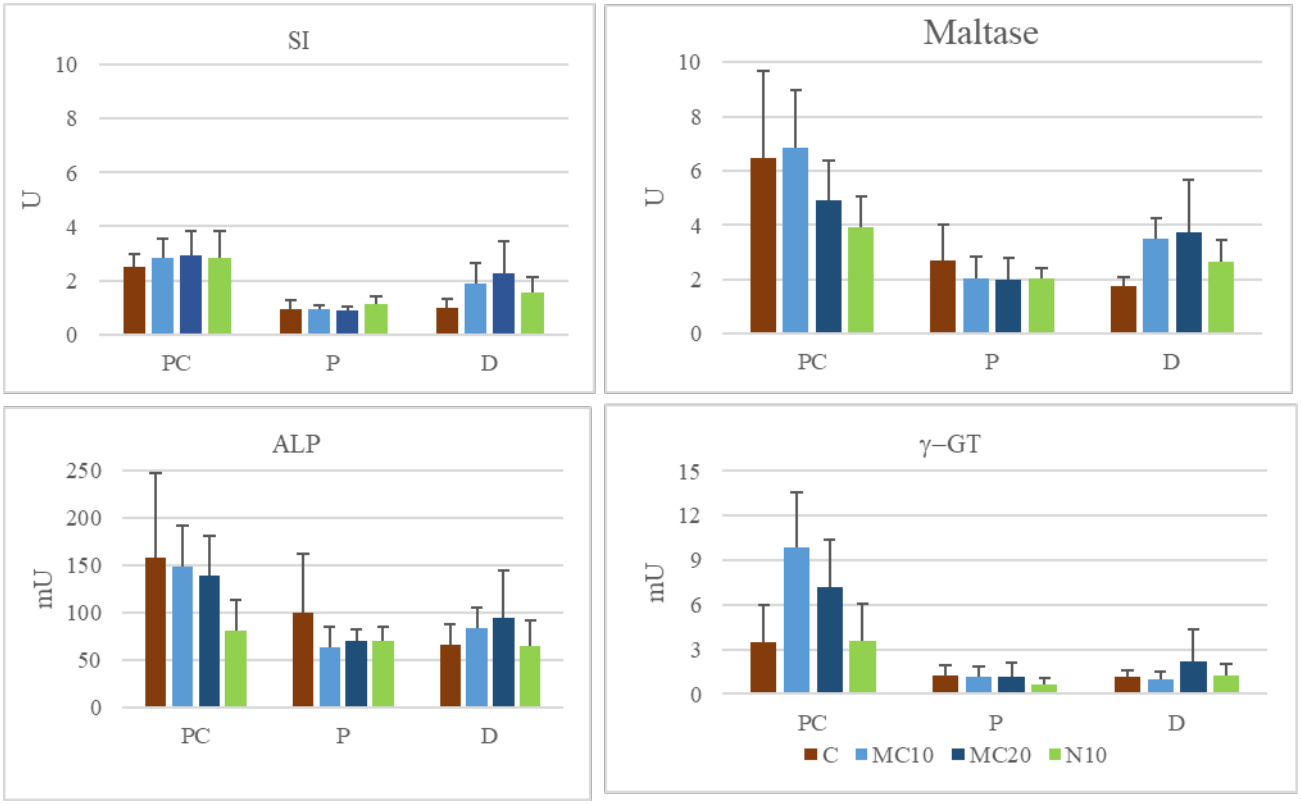


***Figure 19**. Activité enzymatique spécifique de SI, maltase, ALP et γ-GT dans PC, P et D du bar européen nourri avec les régimes expérimentaux pendant 75 jours. Les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart-type (n=9). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les régimes de traitement (exposant minuscule P < 0,05, exposant majuscule P < 0,001). Alkaline phosphatase (ALP), sucrase-isomaltase (SI), γ-glutamyl transpeptidase (γ-GT). Pyloric caeca (PC), distal intestine (D), proximal intestine (P).*

Dans les caeca pyloriques, la valeur la plus élevée a été observée chez les poissons nourris avec le régime MC10. L'activité de l'alkaline phosphatase n'a jamais été affectée par les traitements diététiques (P > 0,05).

Discussion sur les performances zootechniques

L'intérêt de l'utilisation de la biomasse sèche de microalgues dans les aliments aquacoles est récent. Plusieurs études ont déjà testé les effets de leur inclusion alimentaire dans les essais in vivo sur différentes espèces de poissons (Cardinaletti *et al.*, 2018). Diverses espèces de microalgues, telles que *Gracilaria gracilis, Nannochloropsis oceanica, Tisochrysis lutea et Tetraselmis suecica*, ont été utilisées en remplacement partiel de la farine de poisson dans les régimes pour le bar européen, sans effets néfastes sur les performances zootechniques et la physiologie intestinale (Messina et al., 2019; Tibaldi et al., 2015; Tulli et al., 2012; Valente et al., 2019). *Isochrysis sp.* a également été proposée comme source d'acides gras polyinsaturés (AGPI) de type oméga-3 en substitution partielle de la farine de poisson dans le régime alimentaire du bar européen, sans aucun effet sur la prise alimentaire ou les performances zootechniques (Tibaldi *et al.*, 2015). Des résultats similaires chez la même espèce de poisson ont été obtenus par Haas *et al.* (2015) lorsqu'une partie de l'huile de poisson a été remplacée par *Pavlova viridis* et *Nannochloropsis sp*. Dans la présente étude, le traitement avec la farine de

consortium de microalgues marines n'a pas affecté significativement l'aspect histologique du foie et de l'intestin, ni l'activité enzymatique.

Contrairement à la grande majorité des études précédentes utilisant des cultures monosouches de microalgues pour la substitution des huiles ou des farines de poissons, le consortium marin testé contenait un certain nombre d'organismes différents, à savoir *Oocystis sp.* (80 %), *Tetraselmis sp.* (6 %), *Chlorelle stigmaphore, Chlamydomonas sp*., *Nannochloropsis gaditana*, *Nannochloris sp*., des rotifères, ainsi que des ciliés Lacrymariidae ou Strombidiidae. La souche naturelle *Oocystis* est une microalgue verte généralement associée à une eau douce, mais dont les souches *marina*, *naegelii* et *submarina* vivent dans un milieu marin ou saumâtre. Dans notre étude, c'est probablement l'une de ces souches capables de se développer dans une eau salée. *Oocystis heteromucosa* appartient aux souches du consortium d'algues marines déjà retrouvé près des eaux usées d'étangs marins d'aquaculture avec une tolérance élevée à l'ammoniac (Katayama *et al.*, 2020).

Seuls les poissons nourris avec une inclusion de 10 % de microalgues issues du consortium (MC10) ont atteint un niveau de poids corporel final plus élevé que le régime témoin. Le régime MC20 avait une performance de croissance qui ne diffère pas des autres traitements, mais qui a entraîné une augmentation significative du FCR et donc une baisse de l'efficacité de transformation. Ce phénomène avait déjà été remarqué par Walker and Berlinsky (2011) sur la morue avec l'inclusion à 30 % d'un mélange *Nannochloropsis sp.* et *Isochrysis sp*. Les résultats de la présente étude sont aussi en accord avec ceux de Dallaire *et al.* (2007) qui avaient conclu qu'un taux d'inclusion entre 12,5 % et 25 % dans le régime alimentaire de la truite, d'un consortium algal naturellement présent en sortie d'une ferme en eau douce, n'altérait pas les performances de croissance des poissons.

Cette étude propose une comparaison avec un régime test comprenant de la biomasse séchée monospécifique de *Nannochloropsis sp*., qui semble plus digeste pour le bar européen que d'autres souches marines (Batista *et al*., 2020a). Dans l'expérimentation nous concernant, *Nannochloropsis sp.* n'a pas affecté de manière significative l'appétence du régime et la prise alimentaire du granulé, la croissance des poissons, ou les indices biométriques par rapport au régime témoin après une période d'alimentation de 75 jours. Ceci confirme l'observation de Batista *et al.* (2020b) sur le bar européen nourri avec 8 % de *Nannochloropsis oceanica.* Valente *et al.* (2019) ont montré que l'inclusion alimentaire jusqu'à 15 % de matières grasses de *Nannochloropsis sp.* peut remplacer la farine de poisson dans l'alimentation du bar européen sans affecter les performances de croissance des poissons, ni les indices biométriques. De plus, Haas *et al.* (2016) ont montré qu'un remplacement de 50 % d'huile de poisson par *Nannochloropsis sp.* n'a pas entravé les performances de croissance du bar européen juvénile. D'autres études considérant différentes inclusions alimentaires de *Nannochloropsis oceanica* indiquent que des niveaux d'inclusion modérés (<15 % du régime alimentaire) n'affectent pas la croissance et la performance alimentaire d'autres espèces de poissons comme le loup tacheté (*Anarhichas minor*) et le saumon atlantique (*Salmo salar*) (Knutsen et al., 2019; Sørensen et al., 2017).

Notre méthode de transformation de la biomasse algale en biomasse sèche par lyophilisation a généré une concentration de cendres due au procédé utilisé (tableau 9). Les cendres pourraient jouer un rôle d'antinutriment, c'est-à-dire d'inhibiteur de l'efficacité d'absorption des nutriments alimentaires. Cet aspect technique pourrait être contourné par l'optimisation des méthodes de séchage de la biomasse algale. L'hypothèse d'une paroi algale trop rigide pour une assimilation totale des cellules algales peut être contournée par des procédés de prétraitement de la farine en utilisant une méthode mécanique telle que la sonification, ou des méthodes enzymatiques déjà éprouvées (Batista *et al.*, 2020a).

***Tableau 9**. Gradient de concentrations de cendres dans les formulations expérimentales et indices de conversion alimentaire chez le bar.*

	Contrôle	*Nanno.*	10% consortium	20% consortium
IC	1.16	1.16	1.16	1.25
Cendres (%MS)	7.8	10.3	12.8	18.3

Discussion sur l'activité enzymatique

Selon les précédentes études (Messina et al., 2019; Tibaldi et al., 2006), les données observées dans la présente étude confirment que les caeca pyloriques constituent le site principal de la digestion des glucides. Dans cette partie de l'intestin, seul le régime N10 contenant du *Nannochloropsis* module l'activité de la maltase comparée à l'aliment témoin. *A contrario*, la partie distale de l'intestin semble affectée par la présence du consortium algal qui stimule l'activité des deux disaccharides. Considérant la quantité décroissante d'amidon dans les régimes MC10 et MC20, on peut supposer que la petite quantité d'amidon fournie par le consortium n'est disponible que dans ce tractus de l'intestin.

Le γ-GT joue un rôle essentiel dans la digestion finale et l'absorption des protéines. C'est l'une des principales enzymes situées dans les microvillosités intestinales. Le γ-GT atteint l'activité de synthèse la plus élevée dans les caeca pyloriques, comme l'ont également rapporté Harpaz *et al.* (2005) en étudiant le bar asiatique *Lates calcarifer* dans une gamme de poids similaire à celle de nos poissons expérimentaux. Au contraire, Messina *et al.* (2019) et Tibaldi *et al.* (2015) pour le bar européen, ainsi que Harpaz and Uni (1999) pour plusieurs autres espèces de poissons, ont constaté une activité plus élevée de γ-GT dans l'intestin distal. Il faut souligner que la taille des poissons étudiés par ces auteurs est beaucoup plus grande que celle du bar européen de la présente expérimentation. L'effet des régimes MC10 et MC20 sur l'importante activité des γ-GT dans les caeca pyloriques (comparé au distal et à l'intestin proximal) pourrait être une conséquence de la qualité des protéines alimentaires des deux formulations ingérées.

La phosphatase alcaline (ALP) est une enzyme provenant des cellules épithéliales matures de l'intestin, et elle est considérée comme un marqueur de l'intégrité intestinale. Dans la présente étude, l'inclusion alimentaire du consortium algal ou de la mono-souche *Nannochloropsis sp.* n'a pas affecté significativement l'activité de l'ALP, indiquant que les microalgues n'ont pas causé de changements fonctionnels majeurs dans l'intégrité intestinale des juvéniles, tel que rapporté précédemment par Batista *et al.* (2020a) et Messina *et al.* (2019) pour le bar européen adulte ou encore la sole (*Solea senegalensis*) étudiée par Vizcaíno *et al.* (2018). Au contraire, une étude précédente de Vizcaino *et al.* (2014) a montré que l'inclusion de *Scenedesmus almeriensis* dans le régime alimentaire de la daurade royale n'affectait pas la croissance des juvéniles, mais entraînait une augmentation en gradient de l'activité de l'ALP en lien avec le gradient du taux d'inclusion de la source algale.

Conclusion

Il s'agit à ce jour de la première étude visant à évaluer le régime alimentaire pour poisson d'aquaculture, en utilisant comme source de matière première une farine de consortium de microalgues marines cultivées en lagunage à haut rendement algal. Les résultats zootechniques de cette étude ont montré que l'inclusion de 20 % de farine de consortium naturel algal dans la formulation des aliments pour bar européen n'affectait pas la palatabilité, la croissance ou la composition corporelle du bar européen dans

une gamme de poids entre 18-65 grammes. À partir de 20 % d'inclusion, l'indice de conversion est significativement altéré, avec une conversion des nutriments moins efficace, alors que la structure digestive reste intacte et que l'activité enzymatique n'est pas différente des autres traitements CTRL, N10 et MC10. Le niveau du FCR pour MC20 laisse supposer qu'une substitution plus importante risque d'avoir un impact croissant sur l'efficacité alimentaire.

Dans le cadre du développement du concept d'aquacultures durables, l'usage des effluents de ferme aquacole pour cultiver des consortia naturels non axéniques sur de grandes surfaces semble être une piste prometteuse pour développer des circuits de valorisation de rejets. De plus, cette culture d'algues pourrait subvenir à un approvisionnement de matière première pour la formulation d'aliment aquacole dans un esprit de système circulaire. De fait, les productions primaires terrestres (céréales ou légumineuses) consommables directement par les populations des pays à faibles revenus seront moins préemptées pour les formulations destinées à l'aquaculture intensive. Il en va de même pour les prélèvements effectués dans les océans en vue de produire les huiles et farines de poissons pour l'industrie aquacole.

Une telle approche nécessite encore des efforts de recherche, notamment sur la variabilité des compositions de cultures algales en fonction des saisons. Un champ de recherche prometteur concerne l'orientation métabolique des cultures algales afin de faire produire de façon stable par la microalgue des composés d'intérêt pour l'alimentation aquacole, tels que les AGPI. L'optimisation de la digestibilité des farines algales par un process de prédigestion, tel qu'on peut le trouver pour les farines de poissons sauvages, est aussi une piste de recherche privilégiée.

5 L'APPROCHE INNOVANTE DE l'AQUACULTURE SPATIALE

Intégrées à un système d'aquaculture intensive de type AMTI, les cultures de microalgues jouent un rôle de premier rang dans l'épuration des rejets aquacoles, et pourraient donc fournir une partie de la source alimentaire des organismes élevés. Les recherches tendent à comprendre et maîtriser l'ensemble des maillons constitutifs d'une AMTI en milieu clos et contrôlé (traitement de l'eau de la boucle primaire de poissons, épuration et valorisation des matières dissoutes et particulaires) dans un objectif de circularité alimentaire. Les boucles précédemment étudiées sont closes en matière de circulation d'eau et de recyclage des molécules de rejets, mais elles restent toutefois ouvertes au contact de l'environnement aérien.

La modélisation de chaque maillon d'une AMTI et de leurs interactions autorise à envisager un concept de haute technologie proposant un système entièrement compartimenté où les échanges et les flux gazeux seraient valorisés au sein même du système sans échanges avec l'extérieur.

La première application candidate pour l'étude de tels systèmes est l'exploration spatiale à travers les divers projets de base lunaire (Bluem and Paris, 2001a; Blüm et al., 1994) pour lesquels une nouvelle agriculture en milieu totalement clos et contrôlé est à inventer.

Ce chapitre propose d'argumenter la pertinence de la présence d'un organisme aquacole dans une production agricole destinée au support de vie dans l'espace. Toutefois, avant de définir clairement un schéma de système de production de type AMTI sur la Lune, il est nécessaire d'évaluer la faisabilité du transfert vers la Lune des poissons qui rejoindront le dispositif d'aquaculture spatiale. Les contraintes environnementales d'une mission lunaire sont à étudier afin de définir la résistance ou la résilience des organismes face à l'environnement spatial, et éventuellement de proposer des contre-mesures.

À travers le programme LUNAR HATCH, une évaluation de deux types de changements d'environnement directement liés à une mission spatiale (les vibrations et la gravité altérée) est développée.



Przybyla, C., 2021. **Space Aquaculture: Prospects for Raising Aquatic Vertebrates in a Bioregenerative Life-Support System on a Lunar Base**. Frontiers in Astronomy and Space Sciences. 8.

Przybyla, C et al., 2020. **European sea bass (Dicentrarchus labrax) and meagre (Argyrosomus regius) fertilized egg resistance to a spacecraft launcher vibration qualifying test**. Aquaculture International.

Przybyla, C et al., 2023. **Embryogenesis of an aquaculture fish (*Dicentrarchus labrax*) under simulated altered gravity.** Frontiers in space technology**.**

5.1 Exploration spatiale : l'étude de cas d'une aquaculture en milieu contraint, clos et contrôlé

La présence d'une communauté humaine sur la Lune ou sur Mars pour une résidence de longue durée nécessiterait la mise en place d'une unité de production permettant une autonomie alimentaire partielle ou totale. L'un des principaux objectifs d'un système de survie biorégénératif est de fournir des sources de nourriture pour l'équipage en utilisant ou en recyclant des ressources *in situ*.

Les plantes potagères en milieu fermé et en environnement spatial

Des premières plantes envoyées dans l'espace en 1960 avec *Spoutnik 2* aux expériences actuelles menées dans la Station spatiale internationale (ISS), les réponses physiologiques de plusieurs plantes terrestres dans des conditions de microgravité ont été étudiées pour leur potentiel de développement en « astrocultures » (Zabel *et al.*, 2016). L'environnement d'une serre de culture sera différent sur la Lune (Zeidler *et al.*, 2017) ou sur Mars (Bamsey *et al.*, 2009), et les plantes devront s'acclimater à l'environnement et aux nutriments locaux disponibles. Un projet VEGGIE mené en orbite basse dans l'ISS par la NASA a fourni la première laitue de taille comestible entièrement produite en conditions réelles de microgravité (Khodadad *et al.*, 2020). La liste des plantes candidates à la culture dans des conditions d'un BLSS comprend plus d'une dizaine d'espèces : blé, riz, soja, arachide, poivron, carotte, tomate, coriandre, laitue, radis, courge, oignon et ail (El-Nakhel et al., 2019; Liu et al., 2008; Paradiso et al., 2012). Des céréales, des légumes et des fruits pourraient apporter des glucides, du phosphore, de la pré-vitamine A, des vitamines B1, B6, B9 et C. Cependant, la qualité et la quantité de protéines et de lipides apportés par les végétaux sont souvent négligeables par rapport à celles des sources animales.

La photosynthèse aquatique dans l'espace

Les microalgues constituent une source potentielle de nourriture. Elles sont très diversifiées, et elles offrent un large éventail de stratégies physiologiques et de compositions. À ce jour, quelques souches de microalgues ont été étudiées en orbite basse pour des expériences dans un environnement spatial. Parmi elles, *Sphaerocystis sp*., une chlorophycée (algue verte polaire/pergélisol), dont une culture a résidé 530 jours sur un panneau extérieur à l'ISS dans le projet BIOMEX, alternant des températures allant de -20° C dans l'obscurité à 47,2° C (de Vera *et al.*, 2019). *Chlorella sp*. est une souche de microalgues très bien décrite dans la littérature scientifique aquacole (voir chapitres 3 et 4) pour ses vertus épuratrices (Yang *et al.*, 2012) ou alimentaires (Batista et al., 2020a; Gamble et al., 2021; Gilles et al., 2013). C'est aussi une souche très utilisée dans la recherche spatiale pour les mêmes raisons que sur Terre (Niederwieser et al., 2018b). Au total, plus de 51 expérimentations se sont déroulées lors de missions spatiales utilisant des algues vertes (Chlorophyta), des cyanobactéries (Cyanophyta) ou des Euglenophyta afin de connaître l'influence du milieu spatial sur les cultures (Niederwieser et al., 2018a).

L'aquaculture spatiale, une source de nutrition complémentaire aux végétaux terrestres

L'environnement spatial en gravité altérée peut avoir des effets négatifs sur la physiologie humaine, notamment la perte osseuse et musculaire. NF-κB est un activateur transcriptionnel de nombreux gènes, dont certains conduisent à une atrophie musculaire et à une résorption osseuse, ce qui constitue une préoccupation importante pour les astronautes. Une étude sur des séjours d'astronautes de courte durée a confirmé que l'assimilation de 50 µM d'acide eicosapentaénoïque (EPA) pendant 24 heures a diminué

l'activation du NF-κb. Ensemble, ces données fournissent des preuves préliminaires du potentiel de l'EPA à contrecarrer la perte osseuse associée aux vols spatiaux, cet acide gras n-3 pouvant être apporté par un régime à base de poissons d'élevage. Une consommation plus élevée de poisson chez les astronautes pendant 4 à 6 mois sur la Station spatiale internationale a été associée à une densité minérale osseuse plus élevée. Ce résultat permet d'envisager, à travers une nutrition riche en acides gras n-3, une contre-mesure (parmi d'autres) pour contrer la perte osseuse associée aux vols spatiaux ou à une résidence sur la Lune (Douglas et al., 2020; Smith et al., 2010; Zwart et al., 2010).

Dans l'état actuel des connaissances en propulsion spatiale, un voyage prend 4 à 7 jours vers la Lune, et 5 à 8 mois vers Mars. Réapprovisionner en sources alimentaires une base spatiale depuis la Terre sur un rythme mensuel n'est réalisable ni économiquement ni technologiquement. Une solution consisterait à fournir des aliments spatiaux transformés et préemballés. Cependant, la conservation lyophilisée est instable dans le temps, surtout concernant les nutriments essentiels tels que le potassium, le calcium, la vitamine D, ainsi que la vitamine K, qui est impliquée dans les muscles et l'entretien osseux. Les micronutriments les plus sensibles à la dégradation au stockage sont les vitamines A, C, B1 et B6 après un an à température ambiante (Cooper *et al.*, 2017). Une stratégie envisageable pour les bases spatiales serait de coupler une production fraîche locale avec des aliments à conservation courte apportés par des cargos. Des études récentes ont montré que les besoins énergétiques alimentaires pendant un vol spatial sont similaires à ceux requis sur Terre. Si l'apport énergétique est réduit, le corps humain est soumis à un stress physiologique entraînant des problèmes cardiovasculaires, une déminéralisation osseuse, une atrophie musculaire et une déficience du système immunitaire.

L'exposition à la microgravité réduit le bilan azoté dans le corps d'un astronaute, ce qui a pour conséquence une réduction de 30 % de la synthèse des protéines (Stein and Blanc, 2011). Il est donc nécessaire d'envisager l'ingestion de protéines afin de compenser le phénomène. Une autre étude menée sur un équipage de la navette spatiale analysait la consommation d'aliments couramment utilisés dans l'espace, et a montré qu'une augmentation de consommation de glucides (issus de plantes) et une diminution des protéines et des graisses animales peuvent perturber l'équilibre physiologique. Idéalement, un aliment frais d'origine animale devrait être inclus dans le régime alimentaire des résidents de l'espace (Gretebeck *et al.*, 1994).

Les produits de la mer sont l'une des sources alimentaires les plus saines pour l'espèce humaine. Leurs mérites nutritionnels et leurs bienfaits protecteurs ont été abondamment décrits et synthétisés par Tacon *et al.* (2020). Comme les poissons sauvages, les poissons d'aquaculture synthétisent des protéines digestibles, des lipides, et stockent des acides aminés, des vitamines et des minéraux essentiels. En plus des micronutriments, l'élevage de poissons d'eau salée, saumâtre ou douce peut séquestrer dans la chair de ces derniers une quantité d'acide alpha-linolénique (ALA-précurseur d'AGPI), d'acide eicosapentaénoïque (EPA) ou d'acide docosahexaénoïque (DHA) issue de leur riche alimentation (Arthur, 2009; Tocher, 2015). Ces composés produits par la symbiose algale et bactérienne rentrent dans la chaîne trophique naturelle par la prédation de microalgues riches telles que *Tetraselmis sp.* ou *Isochrysis sp.* (Vizcaíno *et al.*, 2016). Plusieurs poissons d'aquaculture ont la capacité physiologique de produire de l'EPA et du DHA, à partir de la chaîne ALA apportée par l'alimentation, et de stocker ces composés essentiels dans leur chair (Gregory et al., 2016; Morais et al., 2015). Ceci constitue un atout alimentaire en complément de la source végétale.

5.1.1 De l'eau dans le système solaire ?

C'est une vision contre-intuitive, mais l'eau appartient à une classe de molécules bien représentée dans le système solaire et même au-delà. L'hydrogène et l'oxygène sont deux atomes abondants dans l'Univers, et leur association pour former l'eau peut être observée partout dans le système solaire. L'eau moléculaire a été détectée sur de nombreuses planètes rocheuses telles que Mars, Mercure et Vénus (Liu, 2019; McCubbin and Barnes, 2019; Orosei et al., 2018). Les océans de la planète Terre recouvrent plus de 70 % de sa surface, mais proportionnellement, l'eau sous toutes ses formes (gazeuse, liquide et solide) ne représente qu'une infime partie de la masse terrestre comparée à d'autres corps du système solaire.

Il existe des preuves de la présence d'océans bien plus importants que sur Terre (figure 20) logés sous la glace de lunes de planètes telles qu'Encelade (Cadek *et al.*, 2016) ou encore Europa (Kalousova *et al.*, 2016). Des recherches récentes ont mis au jour la présence de molécules d'eau sur des exoplanètes rocheuses appartenant à d'autres systèmes solaires de notre galaxie (Olson *et al.*, 2020).



Figure 20. *Bilan hydraulique de la Terre (océans, rivières, lacs, calottes glaciaires, eaux souterraines) comparé au bilan hydraulique estimé des océans sur Europe, Ganymède et Titan (crédits : PHL@UPRArecibo-JPL/Caltech).*

L'eau est la principale ressource *in situ* nécessaire à la résidence d'humains, à moyen ou long terme lors d'une mission planétaire. Sans présence d'eau, l'exploration spatiale reste compromise, et avec elle les projets de support biologique de la vie dans l'espace.

Paradoxalement, c'est l'astre le plus proche de la Terre qui est le moins bien documenté sur son potentiel hydraulique. Une mission lunaire révèle que la forme hydroxyle (OH) est largement présente dans le régolithe. L'absence d'atmosphère et une gravité d'environ 1/6^{e} de celle de la Terre laissent échapper ces molécules d'eau et hydroxyles dans l'espace. Toutefois, il sera possible d'utiliser cette source moléculaire pour reconstituer de l'eau en grande quantité (Basilevsky et al., 2012; Honniball et al., 2021; Liu et al., 2012; Putrevu et al., 2016).

Le plus grand espoir réside dans l'utilisation des glaces éternelles constituées d'eaux situées au fond des cratères lunaires des pôles sud de la Lune, qui ne bénéficient jamais de la lumière solaire (Calla et al., 2016; Eke et al., 2014). À ce jour, aucune information n'est disponible quant à la qualité de cette eau.

5.1.2 Pourquoi l'organisme aquatique est-il un bon candidat pour un système biorégénératif lunaire ?

Produire des protéines animales à partir d'élevages d'animaux terrestres (volailles, bovins, ovins) en faible gravité semble difficilement envisageable. Une grande surface est nécessaire pour ce type d'élevage. Celle-ci rentrerait directement en concurrence avec l'espace alloué (et pressurisé) aux équipages. De plus, du point de vue de la gestion du traitement des gaz, le flux gazeux issu de la respiration (CO_2) ou des flatulences (CH_4) du cheptel de vertébrés terrestres viendrait s'additionner à celui des résidents lunaires et alourdir ainsi le système d'épuration de l'air.

En raison de leur physiologie poïkilotherme, les organismes aquatiques ont besoin de cinq à vingt fois moins d'énergie que les mammifères pour se développer, environ trois fois moins d'oxygène, et donc produisent moins de CO_2 (figure 21). Cet atout est une considération importante pour la gestion des échanges gazeux dans un BLSS spatial (Gonzales, 2009). Les gaz de respiration du poisson sont dissous directement dans le volume d'eau d'élevage, et facilement utilisables par une culture algale sans nécessiter un processus technologique de séparation des phases liquides et gazeuses.

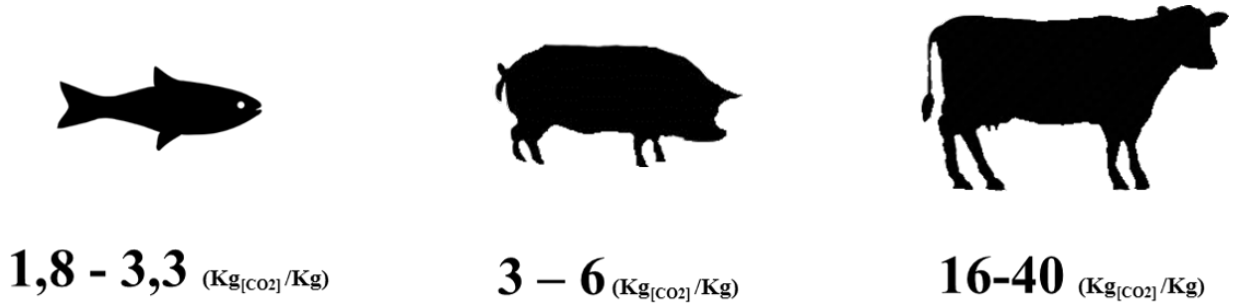


Figure 21. *Production d'origine biologique de CO_2 issu de la respiration de divers animaux d'élevage, exprimée en kg de gaz émis par kg de biomasse animale (Przybyla, 2021).*

Un autre point sensible est la gestion des déchets. Avec des animaux terrestres comme les porcs, les poulets, les chèvres ou les vaches, la collecte des matières fécales reste compliquée en microgravité et potentiellement chronophage pour l'équipage. Pour les poissons, les matières particulaires évoluent dans l'eau, peuvent être décantées et dirigées vers des systèmes de bioremédiation par des détritivores aquatiques (Galasso *et al.*, 2020). Enfin, par rapport aux élevages d'animaux terrestres, l'aquaculture est généralement considérée comme une activité de transformation alimentaire dont l'indice de conversion alimentaire, c'est-à-dire la biomasse alimentaire nécessaire à fournir pour croître d'un kilogramme, reste nettement inférieure à celle de la plupart des vertébrés terrestres (Tacon and Metian, 2008). L'indice de conversion comparatif pour différents organismes aquacoles et animaux terrestres d'élevage est présenté en figure 22.

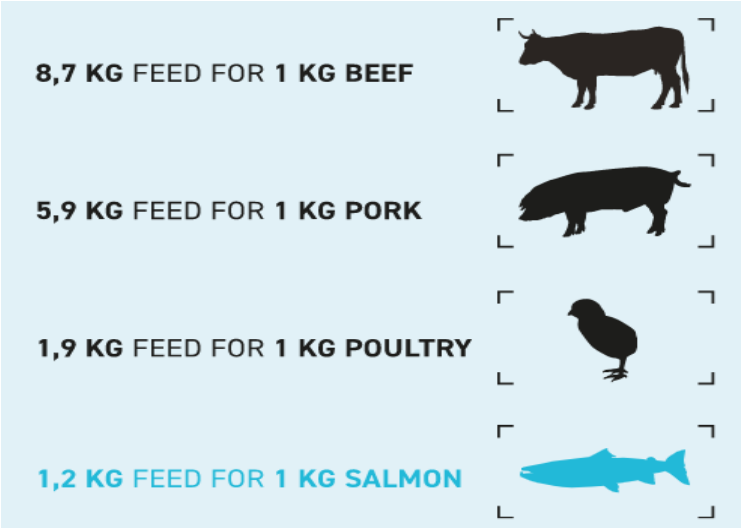


Figure 22. *Indices de conversion de divers animaux d'élevage (source : MMC first process).*

Un autre avantage conféré à l'organisme aquatique en milieu spatial, contrairement aux organismes aériens, est la protection aux rayonnements cosmiques que procure l'eau d'élevage. L'eau est un bouclier connu et efficace contre les particules énergétiques (neutrons, protons, ions métalliques secondaires) délétères pour l'intégrité et la physiologie des organismes exposés. Une couche d'eau de quelques centimètres peut atténuer les effets sur la biologie des particules chargées (Vuolo *et al.*, 2017).

5.1.3 Une AMTI sur la Lune : une innovation technologique en milieu clos, contrôlé et extrême

L'AMTI en système bouclé, contrôlé et extrême sur la Lune offre un sujet stimulant dont les réflexions et les avancées dans la connaissance impacteront, sans aucun doute, la recherche terrestre pour réduire la pression anthropique sur les écosystèmes naturels. La pisciculture et la culture d'organismes photosynthétiques (algues ou végétaux) dans l'espace permettront aux résidents de missions de longue durée d'accéder à une nourriture fraîche dans un principe de recyclage total des molécules importées sur place, émises par les organismes élevés ou cultivés. L'enjeu est de pouvoir proposer une autonomie partielle d'alimentation entre deux ravitaillements de cargo prévus tous les 4 à 5 mois. La Lune est un corps céleste sans vie, sans atmosphère, ayant un sol de type régolithe sans fertilisant naturel. Quelle que soit la molécule importée ou émise par un rejet dans cet environnement pauvre, sa valeur biologique est très importante et vitale dans un système circulaire. L'intérêt de la recycler est grand, car elle a été importée. L'AMTI lunaire répond donc à ce schéma de recyclage moléculaire total.

Toutefois, toutes les boucles en circuit fermé (électriques, biologiques, mécaniques, physiques) ne sont jamais totalement closes, car un intrant régulier est nécessaire pour compenser la dissipation d'énergie. Pour les AMTI lunaires, l'apport liquide nouveau pour compenser la perte (même minime) d'eau peut s'envisager avec une eau issue du recyclage des fluides et des rejets humains (urines et fèces) qui auront été traités par une boucle algale ou, si elle est disponible, par une eau de fonte de glace lunaire.

Concernant l'intrant de l'alimentation aquacole de l'AMTI lunaire, en addition des microalgues déjà évoquées dans le chapitre 4, une étude de la NASA envisage d'incorporer un maillon complémentaire d'invertébrés aquatiques afin de pérenniser la cascade trophique et de fournir une nouvelle source autoproduite d'aliment complémentaire (Pickett *et al.*, 2020). Les déchets de cuisine, d'agriculture spatiale

sous serre, ou encore les restes alimentaires peuvent aussi contribuer à la chaîne alimentaire de l'AMTI lunaire, à l'image de l'aquaculture extensive asiatique.

L'étude de l'AMTI en milieu lunaire est un cas extrême d'aquaculture technologique visant à compartimenter totalement les maillons sans possibilité de jouer avec la dilution des rejets dissous avec les ressources en eau ou les dissolutions gazeuses avec une atmosphère. Ce sujet relève plusieurs défis : (i) conforter les connaissances sur les flux gazeux et liquides circulants d'une AMTI, (ii) connecter de façon hermétique et permanente les compartiments de chaque organisme entre eux, et (iii) optimiser l'interaction biologique entre les organismes et leurs maillons technologiques dans un environnement en gravité altérée et exposé aux rayonnements cosmiques.

5.1.4 Les missions spatiales avec poissons d'aquarium pour la recherche en médecine

Le premier vol spatial avec des petits poissons d'aquarium a eu lieu le 28 juillet 1973. Deux alevins et cinquante œufs embryonnés de *Fundulus heteroclitus*, un poisson évoluant dans les marais salants de Floride, ont été enfermés dans un sac en plastique transparent et lancés par une fusée *Saturn 1B* à destination de la station orbitale *Skylab*. Pendant trois jours, une nage en boucle a été observée pour les deux alevins, puis progressivement, les poissons ont retrouvé un comportement identique à celui des témoins terrestres. La période d'acclimatation des poissons à la microgravité est comparable à celle de l'équipage humain lors de la mission. Cette observation a suggéré que la fonction vestibulaire (nommée « otolithe » pour les poissons, et « oreille interne » pour les humains) joue probablement le même rôle sensoriel en microgravité. Les œufs de *killifish* fécondés ont éclos avec succès durant la mission avec un taux d'éclosion de 96 %. Les alevins éclos ont montré un comportement de nage normal, contrairement à leurs premières heures en micropesanteur (von Baumgarten *et al.*, 1975). Cette observation suggère que durant l'embryogenèse en microgravité, l'embryon développe une stratégie physiologique pour compenser cet environnement inhabituel. Ainsi, les larves écloses étaient déjà adaptées à la microgravité, comme en témoigne l'absence de comportement de nage en boucle.

En 1975, lors d'une mission *Apollo-Soyouz* de 9 jours, toujours avec la même espèce de poisson d'aquarium (des juvéniles de 21 jours ont été exposés à une microgravité réelle en orbite basse), une nage irrégulière similaire à celle de la première mission a été observée. Des œufs fécondés de la même espèce ont également été embarqués (n=100/échantillons) à 32 hpf (heures post-fécondation), 66 hpf et 128 hpf, puis ramenés sur Terre jusqu'à l'éclosion. Le taux d'éclosion d'embryons était de 75 %, et les œufs issus de la mission spatiale ont éclos 6 jours avant les témoins restés au sol durant toute l'embryogénèse. Apparemment, le développement des œufs était plus rapide en microgravité. Toutefois, les embryons ne présentaient aucune anomalie résultant du développement dans un environnement d'apesanteur (Hoffman *et al.*, 1977).

En avril 1998, une autre population de *Xiphophorus helleri* et 4 poissons marins sauvages adultes Oyster toadfish (*Opsanus tau*) furent hébergés dans le Neurolab d'une navette spatiale américaine pendant 16 jours pour des études de neurologie. Les contacts synaptiques du cerveau des poissons ont été comparés à ceux d'une population témoin à gravité 1 g sur Terre. L'environnement de microgravité a provoqué une augmentation des contacts synaptiques dans le noyau vestibulaire, indiquant une adaptation des juvéniles de *Xiphophorus* à leur nouvel environnement (Ibsch *et al.*, 2000). Les résultats ont aussi révélé un processus de compensation gravitaire en lien avec le rôle de la ligne latérale du poisson et la perception des mouvements (Anken *et al.*, 2002).

Par chance, un comportement d'accouplement dans l'espace a été filmé en microgravité au 33e jour d'une mission japonaise. L'analyse des images nous apprend que les parades amoureuses sont sensiblement les mêmes dans l'espace et sur Terre, ce qui laisse penser que la microgravité ne modifie pas cet aspect de la reproduction du médaka. Les poissons d'aquarium utilisés pour cette expérimentation ont subi un prétraitement des cellules ostéoclastes par fluorescence, afin de faciliter leurs observations. Un ostéoclaste est un type de cellule osseuse qui décompose le tissu osseux et qui se trouve être responsable de la perte osseuse. Après 47 jours dans l'espace, les poissons avaient tendance à rester immobiles dans le bassin. Au bout de 56 jours, le groupe de poissons de la mission avait une croissance normale par rapport à celle d'un groupe témoin terrestre, mais l'altération de certaines fonctions physiologiques s'est accompagnée d'une activité des ostéoclastes et d'une légère diminution de la densité minérale de la vertèbre (Chatani et al., 2015; Chatani et al., 2016; Murata et al., 2015).

5.1.5 Les missions spatiales avec des embryons de poissons d'aquarium

En 1994, l'équipage de la navette spatiale *Columbia* embarque à bord des médakas japonais (*Oryzias latipes*) pendant 15 jours. Ces poissons d'ornement ont pondu des œufs durant la mission en orbite terrestre, et une éclosion normale a été observée dans l'espace, avec des résultats montrant que la fécondation du médaka et le développement embryonnaire n'ont pas été altérés par la microgravité (Ijiri, 1998).

En 2003, 4 œufs fécondés de médakas fertilisés sur Terre dans un environnement contrôlé de type RAS ont été mis en orbite par la navette spatiale *Columbia* alors que 4 autres œufs au même stade de développement sont restés au sol en qualité de lot témoin. Contrairement aux observations relevées pour le *killifish*, aucune différence n'a été identifiée dans le temps de développement des embryons : ce dernier était le même dans les deux conditions de gravité. Dans l'expérience au sol, les embryons tournaient dans la membrane de l'œuf, alors qu'en vol, ils restaient immobiles. La mission a pu enregistrer l'éclosion durant le vol en orbite, 8 jours après le lancement de la mission, tandis que les 4 œufs au sol avaient éclos. La caméra embarquée montre que le jeune alevin éclos dans l'espace se déplace en fonction des références de la chambre du vaisseau (la source de lumière artificielle représente le haut), tandis que les juvéniles du lot témoin ont une nage orientée en fonction du vecteur de gravité terrestre. Les résultats n'ont pas révélé de différences notables dans le temps du développement des embryons entre l'espace et l'expérience au sol (Niihori *et al.*, 2004). Après l'éclosion de la larve de médaka, les embryons et l'équipage de la mission spatiale ne sont jamais revenus sur Terre en raison de l'accident tragique survenu lors de la rentrée dans l'atmosphère terrestre de la navette *Columbia*, le 1er février 2003.

Afin d'étudier la réaction des jeunes poissons à la microgravité à un stade précoce, deux missions utilisant des médakas ont été programmées sur l'ISS, en 2012 et en 2014. À deux reprises, un lot de 24 médakas juvéniles (6 semaines après l'éclosion, 16 mm) est filmé en même temps que des lots témoins restés sur Terre. Les images ont montré que les poissons se sont adaptés à la vie en microgravité après une phase de nage inhabituelle (https://www.youtube.com/watch?v=D-DYU6DlWj8).

5.1.6 Les missions spatiales avec poissons d'aquaculture

À ce jour, très peu de missions spatiales ont embarqué une espèce aquacole, et la littérature se limite à quelques espèces dans des missions ayant pour vocation de fournir des données sur des observations

neurologiques pouvant être un modèle pour la médecine humaine. Aucun projet de recherche n'a tenté de caractériser les performances zootechniques ou la qualité nutritionnelle d'un poisson élevé dans l'espace avec l'objectif de définir son potentiel aquacole pour un programme d'aquaculture spatiale.

La carpe commune (*Cyprinus carpio*), considérée comme une espèce aquacole très importante dans de nombreux pays, a été choisie comme modèle pour être équipée d'un capteur de motricité pour une expérimentation en gravité altérée réelle. Deux carpes adultes (16 mois, 26 cm et 263-270 g) ont été transportées en 1992 vers un laboratoire en orbite terrestre. L'une des deux carpes a subi une labyrinthectomie, une opération destinée à retirer une paire d'otolithes. Pour les deux poissons, le comportement de nage et la réponse dorsale à la lumière ont été étudiés. Comme observé lors des premières missions spatiales avec de petits poissons d'aquarium, la carpe avec otolithes avait une nage érratique (associée à une sorte du mal des transports de l'espace) pendant les trois premiers jours, puis a retrouvé son comportement de nage identique à celui observé sur Terre. La carpe dont les otolithes ont été retirés deux mois avant la mission a montré une perturbation de la motricité pendant les deux jours suivant l'arrivée en microgravité (comme la carpe normale). Ces observations fournissent la preuve d'un trouble sensoriel de motricité au cours de la première phase d'adaptation à la microgravité chez ce poisson d'aquaculture (Mori *et al.*, 1994).

Le tilapia *Oreochromis mossambicus* est aussi l'une des rares espèces de poissons d'aquaculture ayant participé à des recherches sur le système vestibulaire sans que la finalité de la mission soit d'en étudier son potentiel aquacole. L'objectif de l'étude était de déterminer si le développement du système vestibulaire du poisson en microgravité pouvait être perturbé entre 1 et 4 jours après l'éclosion. Une altération des fonctions sensorielles à un âge précoce a été observée, avec l'hypothèse d'une action réversible lors d'un retour à une gravité à 1 g (Sebastian *et al.*, 2001).

5.1.1 Un essai d'écosystème aquatique en microgravité

C'est probablement l'expérience aquatique en boucle fermée dans l'espace la plus impressionnante entreprise à ce jour. Une équipe allemande de l'agence spatiale allemande DRL a fait voler en orbite basse terrestre un écosystème multitrophique aquatique en eau douce nommé CEBAS (*Closed equilibrated biological aquatic system*) contenant de petits poissons d'aquarium (*Xiphophorus hellerii*), des escargots d'eau (*Biomphalaria glabrata*), des plantes aquatiques (*Ceratophyllum demersum*) et des micro-organismes de type bactérien (figure 23). La démonstration au sol a montré qu'un système de filtration était capable de maintenir de façon stable pendant plusieurs mois cet écosystème aquatique artificiel fermé. Ce système a recyclé les déchets produits par la biomasse vivante et morte sans diminuer la concentration en oxygène au-dessous de 3,5 mg/l à 25 °C (Bluem and Paris, 2001b; Blum, 2003; Blum et al., 1994; Blum et al., 1995).

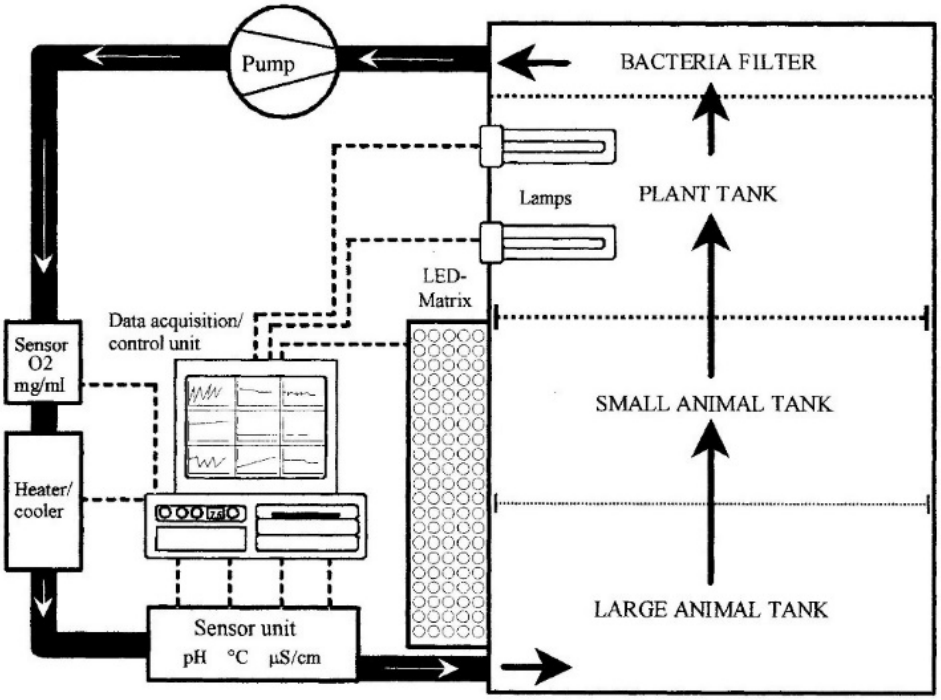


Figure 23. *Schéma du module spatial aquatique CEBAS démontrant le concept de l'écosystème naturel équilibré en eau douce, comportant poissons d'aquarium, escargots, plantes et bactéries (extrait de Bluem* et al.*, 2000).*

En janvier 1998, le système a à nouveau volé lors de la mission de la navette spatiale *Endeavour STS-89* vers la station *Mir*. Il a été exposé à la microgravité durant 9 jours avec 200 juvéniles de poissons et 4 poissons femelles adultes. Les observations ont montré que les conditions spatiales n'ont pas impacté l'équilibre biologique de cet écosystème artificiel durant le séjour en orbite. Les poissons adultes ont été récupérés dans un bon état physiologique. Le taux de survie des juvéniles était de 33 % tandis qu'il a atteint 97 % pour les escargots d'eau douce. Ces derniers se sont rapidement reproduits en microgravité avec 250 nouveaux petits escargots (Bluem *et al.*, 2000).

L'OMEGAHAB (Aquatic Habitat) est un autre écosystème artificiel fermé envoyé 9 ans plus tard en orbite pendant 13 jours à bord d'un vaisseau russe. L'objectif de la mission de nouveau menée par l'agence spatiale allemande DLR était d'étudier la possibilité de concevoir une chaîne trophique en microgravité réelle, mais cette fois-ci avec une microalgue d'eau douce *Euglena gracilis* comme producteur d'oxygène et 26 petites larves de tilapia *Oreochromis mossambicus* soumises à l'étude du développement des organes vestibulaires et à l'analyse de l'activité enzymatique. Le taux de survie des juvéniles était de 42 %, ce qui constitue la meilleure performance jamais atteinte dans une expérience allemande avec des poissons. La microgravité a provoqué une croissance plus forte des otolithes par rapport à celle des poissons restés sur Terre. Cela a conduit à l'hypothèse de l'existence d'une différence dans la capacité à percevoir la gravité dans les deux environnements (Anken *et al.*, 2016). Les microalgues photosynthétiques ont produit des quantités suffisantes d'oxygène pour le compartiment de poissons durant la mission spatiale, démontrant la faisabilité de l'association des deux organismes dans une cascade trophique en milieu clos, contrôlé et extrême (Hader *et al.*, 2006).

5.1.2 Le programme LUNAR HATCH

Depuis 2019, le programme LUNAR HATCH étudie la faisabilité d'expédier des embryons de poissons d'aquaculture, de la Terre à la Lune afin d'alimenter un futur système de production de poissons en AMTI close et contrôlée dans un BLSS lunaire. Les larves écloses seraient ensuite nourries avec des ressources locales produites sur place (voir chapitre 4) et élevées jusqu'à atteindre une taille appropriée pour la consommation humaine. Les arguments pour élever des organismes aquatiques dans l'espace sont nombreux (paragraphe 5.2.1), et les premières observations d'embryons de poissons d'aquarium en microgravité (paragraphe 5.3.4) démontrent que ce stade de vie est robuste et résilient face à un changement d'environnement de type mission spatiale. Du côté des agences spatiales, l'argument d'envoyer des embryons dont l'encombrement est réduit par rapport à un autre stade (1 œuf par ml pour le bar) est économiquement pertinent, car le coût d'une mission s'évalue en masse de charge à transporter. Un kilogramme envoyé vers la Lune coûte aujourd'hui environ 23 000 €. Choisir un stade précoce d'organisme aquatique afin de diminuer le volume d'eau à transporter a tout son sens, économiquement et technologiquement. À l'image des programmes d'agriculture spatiale qui envisagent l'envoi de graines au lieu de plans de légumes, le stade d'œuf de poisson d'aquaculture semble pertinent.

Le programme LUNAR HATCH étudie la viabilité des embryons de poissons d'aquaculture dans diverses expositions à l'environnement spatial. Le bar européen (*Dicentrarchus labrax*) est considéré comme un organisme modèle en aquaculture marine européenne. Toutefois, il s'agit d'un programme proposant un concept dont l'organisme étudié ou la méthodologie proposée peut être discuté ou substitué par d'autres espèces candidates ou d'autres méthodologies. En l'absence de programmes d'aquaculture spatiale concurrents, LUNAR HATCH prospecte également les outils expérimentaux permettant de répondre aux questionnements biologiques posés par ce concept innovant et disruptif. Ce programme d'aquaculture lunaire peut aussi être imaginé vers d'autres destinations comme Mars, et repose sur l'hypothèse que l'aventure spatiale saura exploiter les glaces lunaires ou recomposer de l'eau à partir de l'hydroxyle du régolithe abondant. À ce jour, les sources d'eau découvertes sur les corps du système solaire ont un profil salin ou de saumure (Orosei *et al.*, 2018). Cet état résulte du contact de l'eau et de l'érosion des roches locales. En dehors de la source primaire exploitée localement (transporter de l'eau depuis la Terre n'est pas envisageable), l'eau de recyclage de serre, la serre spatiale de végétaux ou le traitement des matières fécales humaines pourraient constituer des ressources d'eau secondaires pour la pisciculture spatiale.

Avant d'engager avec certitude l'étude de modèle ou de schéma des systèmes de production de poissons sur la Lune, il est nécessaire de vérifier la faisabilité de faire voyager avec succès les organismes aquacoles de la Terre vers la Lune. En comparaison avec une production aquacole industrielle, une mission lunaire comporte de nombreux changements d'environnement. Le programme LUNAR HATCH se divise en plusieurs projets expérimentaux avec une approche mono-paramétrique devant répondre aux questions de l'influence sur l'embryogénèse des vibrations d'un décollage d'un lanceur spatial, de l'effet de l'hypergravité et de la microgravité, et de l'impact à l'exposition aux particules chargées secondaires issues du rayonnement cosmique durant le vol lunaire.

Ces projets sont soutenus financièrement par l'agence spatiale française (Centre national d'études spatiales, CNES), l'European Space Agency (ESA) et la direction scientifique de l'Ifremer. L'agence spatiale américaine (NASA) prospecte la faisabilité d'une connexion du programme LUNAR HATCH avec ses travaux sur le recyclage des urines et des matières fécales d'astronautes par ses systèmes pilotes SAMBR (Suspended Aerobic Membrane BioReactor).

5.2 Influence des vibrations d'un lanceur spatial sur l'embryogenèse de deux espèces de poissons d'aquaculture

5.2.1 Introduction

L'autonomie alimentaire représente un enjeu essentiel pour le futur Moon Village imaginé par l'Agence spatiale européenne. Élever des poissons sur la Lune pourrait fournir aux résidents des éléments nutritifs d'intérêt (voir paragraphe 1.1.4), tels que des acides aminés complémentaires aux plantes produites dans une serre lunaire, des acides gras polyinsaturés oméga-3 (Smith et al., 2010; Zwart et al., 2010), ainsi que des vitamines B12 et D, actrices dans le maintien des fibres musculaires en gravité altérée (Douglas et al., 2020).

Envisager une AMTI sur une base lunaire implique d'étudier les conditions de transport des organismes aquacoles entre la Terre et la Lune. Le programme LUNAR HATCH propose de véhiculer des œufs fécondés de poissons d'aquaculture plutôt que des larves ou des poissons juvéniles. Intuitivement, l'œuf est une structure fragile. Les premières missions soviétiques embarquant des œufs de cailles ont montré des perturbations pendant l'embryogénèse, probablement dues aux diverses influences des paramètres environnementaux lors du lancement, dont les vibrations du véhicule spatial en particulier (Zimmerman, 2003).

Les espèces de poissons candidates

La diversité des espèces de poissons élevées en aquaculture permet d'envisager deux types de candidats possibles pour une aquaculture spatiale : les poissons d'eau douce et les poissons osmorégulateurs de type marin. Si l'eau du BLSS est produite par une combinaison d'hydroxyles présents dans le régolithe (voir paragraphe 5.1.1), alors l'aquaculture en eau douce est envisageable avec des espèces candidates comme le tilapia (Gonzales and Brown, 2006). Si l'eau de la Lune ou du corps céleste d'accueil est minéralisée en raison de fortes interactions géologiques et chimiques sur plusieurs milliards d'années, ou si elle est issue d'un système de recyclage des matières fécales d'origine humaine (extraction des sels de l'urine pour obtenir une eau potable), alors les espèces candidates auront un profil marin. Il faut considérer cette expérimentation comme un concept méthodologique pouvant s'appliquer à d'autres espèces aquacoles.

L'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) a répertorié 360 espèces aquacoles élevées dans le monde (FAO, 2018). Une étude préliminaire basée sur un travail bibliographique (non publiée à ce jour) reliant les tolérances extrêmes à l'environnement des espèces aquacoles de poissons avec les contraintes d'une mission spatiale lunaire a sélectionné 22 poissons d'aquaculture potentiellement candidats. Cette liste de poissons comprend des profils marins, d'eau saumâtre et d'eau douce, des formes fusiformes, des poissons plats, tropicaux ou continentaux. Un poisson candidat sera proposé lorsque la science en saura plus sur la qualité de l'eau extraite ou produite sur la Lune.

Le bar (*Dicentrachus labrax*) et le maigre (*Argyrosomus regius*) sont présents dans cette liste. Le maigre a un développement embryonnaire trois fois plus rapide que le bar européen : 38 heures environ à 18 °C. L'embryogénèse du bar est de 110 heures environ à 13 °C. Choisir ces deux espèces pour cette expérimentation permettra d'évaluer si une relation existe entre la vitesse de développement de l'embryon et la résistance à l'exposition aux vibrations.

Le projet LAUVE (Launch Vibrations on Fish Embryos) a donc étudié l'influence des vibrations d'un lanceur *Soyouz* sur l'embryogenèse de ces deux espèces de poissons élevées en système intensif en aquaculture méditerranéenne. Deux stades embryonnaires ont été testés chez le bar afin d'évaluer si un stade embryonnaire précoce ou tardif était plus résistant aux vibrations.

Une expérience préliminaire a été menée, dans laquelle des œufs fécondés de bar européen ont été centrifugés en laboratoire en rotation orbitale pour évaluer leur comportement en réponse à une vibration intense inhabituelle. Ces expérimentations ont également permis de valider la conception du module expérimental de type CubeSat (nommé LCS) pour la suite de l'expérience en test qualificatif *Soyouz*. Le test de décollage mobilisé est standardisé par l'industrie spatiale, et peut utiliser plusieurs modèles de fusée. Le choix du lanceur est *Soyouz*, car c'est le véhicule qui produit le plus de vibrations. Est-ce qu'en soumettant des embryons de poissons d'aquaculture à des simulations de décollage de *Soyouz*, l'embryogénèse des deux espèces se poursuit jusqu'à l'éclosion ? Un stade embryonnaire est-il plus sensible qu'un autre aux vibrations d'un lanceur spatial ?

5.2.2 Matériels & méthodes

5.2.2.1 *L'enceinte expérimentale accueillant les œufs de poissons*

Pour l'expérience, une enceinte expérimentale entièrement close et étanche, en chlorure de polyvinyle et pouvant contenir 230 ml d'eau de mer, a été spécifiquement réfléchie et conçue par l'équipe expérimentale. Pour éviter que les œufs frappent avec une incidence délétère les parois de ce mini-bassin, l'intérieur de celui-ci n'a pas d'angles. Il est constitué de deux demi-sphères assemblées (figure 24). Le diamètre du réservoir LCS est de 6,4 cm, avec un poids total de 639 g lorsqu'il est rempli de 230 ml d'eau et 200 œufs. Tout le volume du LCS est rempli avec de l'eau de mer. Une attention particulière a été portée pour éviter une bulle d'air gazeuse au-dessus de l'eau, car le mouvement des vagues à l'intérieur du module LCS lors des essais de vibrations serait susceptible de dégazer l'oxygène dissous dans le volume d'eau, compromettant potentiellement la survie des œufs lors de l'exposition aux vibrations.

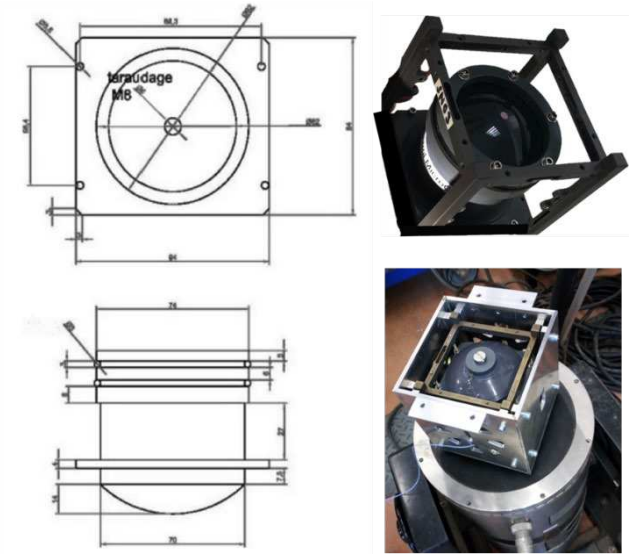


***Figure 24**. Plan de l'enceinte expérimentale et disposition sur le simulateur de vibrations d'un lanceur* Soyouz *(Przybyla* et al.*, 2020).*

5.2.2.2 *Le matériel biologique*

Pour l'expérience préliminaire de rotation orbitale, des œufs ont été produits à la station aquacole de l'Ifremer (à Palavas-les-Flots, France) à partir de géniteurs de bar européen. Jusqu'aux tests de vibrations, 2 000 œufs flottants issus d'une ponte et d'une fécondation contrôlée ont été isolés dans un système d'aquaculture en recirculation (RAS) avec de l'eau de mer maintenue à 15 °C. Pour les essais de qualification avec les vibrations de *Soyouz* qui ont suivi, les œufs de bar et de maigre provenaient d'une ponte naturelle d'une pisciculture locale proche du laboratoire de l'Ifremer. Les œufs fertilisés ont été maintenus dans un RAS à 13 °C pour le bar européen (n = 2000) et à 18 °C pour le maigre (n = 2000) avant la sélection des œufs fécondés pour l'expérience.

5.2.2.3 *Préparation des échantillons d'œufs*

En raison de la possibilité de présence d'œufs non fécondés (taille 1 mm) dans le pool d'œufs, un volume a été prélevé dans l'incubateur pour l'évaluation visuelle de la fécondation à l'aide d'un microscope binoculaire (Motic-w10x20) et d'une cuve Dollfus. Tous les œufs sélectionnés dans les échantillons expérimentaux sont embryonnés. Le plan initial était de mener le test de vibrations sur un stade embryonnaire très précoce du bar européen (8 à 15 heures après fertilisation), mais après plusieurs tentatives, il est devenu clair qu'il était impossible de vérifier la présence d'embryons en dessous de 27 hpf. Ainsi, le premier embryon de bar européen testé dans l'étude était après 30 hpf. Pour le maigre, il a été possible d'évaluer la fertilisation à 14 hpf. Les paramètres et les conditions de l'eau pour les différentes expériences sont présentés dans le tableau 10.

***Tableau 10**. Paramètres environnementaux de l'expérimentation en rotation orbitale et du test de qualification de vibrations* Soyouz.

		European seabass				Meagre
		Orbital rotation 250 t/mn		Soyuz qualification test		
	Embryonic stage exposed (hpf)	56	71	35	83	14
	Percentage of embryo development	60%	76%	32%	75%	38%
	Vibration duration (s)	600	600	600	600	600
Spawning tank	Water temperature (°C)	$15.0^{\pm0.2}$	$14.9^{\pm0.2}$	$13.2^{\pm0.1}$	$13.0^{\pm0.4}$	$13.1^{\pm0.1}$
LAUVE Cube-Sat (LCS) Module	Water temperature (°C)	14.8	14.6	13.6	13.4	18
	Water oxygen concentration ($mg.L^{-1}$)	7.9	NA	21.5	27.5	15.0
	Water oxygen (% saturation)	99	NA	260	335	< 200
Incubator	Water temperature (°C)	$14.6^{\pm1.8}$	15	13.2	13.3	18
	Water salinity (PSU)	37.8	37.8	37.8	37.7	37.6
	Hatching time (hpf)	94	94	110	110	37

5.2.2.4 *Expérience de rotation orbitale*

L'objectif du test de rotation orbitale était à la fois de valider la conception du module expérimental LCS et de tester la capacité des œufs à résister à un stress vibratoire sévère à différents stades embryonnaires. Les échantillons d'œufs à 56 hpf et 71 hpf (n = 200) ont été comptés manuellement, et la présence d'embryons a été vérifiée visuellement. Tous les œufs sélectionnés à partir des échantillons

expérimentaux sont embryonnés. Deux échantillons ont été placés dans des béchers en verre de 250 ml (remplis à 230 ml), et le troisième échantillon a été enfermé dans le LCS (230 ml). Un agitateur orbital (Edmund Bühler KS-15) a appliqué 250 tr/min pendant 15 minutes sur le LCS à l'un des béchers solidement fixé à l'appareil. Le bécher en verre non agité (utilisé comme témoin) a été placé loin du site d'essai pour éviter d'éventuelles vibrations. Après la phase de rotation, les trois échantillons ont été placés individuellement dans des béchers en verre aérés de 230 ml et laissés flotter dans un incubateur cylindrique conique à 14,6 ± 1,8 °C avec un niveau de salinité de 37,8 PSU jusqu'à la fin du développement embryonnaire et de l'éclosion.

5.2.2.5 *Test de qualification aux vibrations sur un modèle Soyouz*

Le triplicata de tests de qualification aux vibrations a été placé dans un environnement de lanceur *Soyouz*, car ce lanceur présente la courbe la plus extrême en matière de vibrations, comparé aux autres lanceurs des différentes nations spatiales. Un excitateur de vibrations (B&K 4801 + 4812) du laboratoire de mécanique et génie civil de l'Université de Montpellier a été utilisé pour imiter les environnements vibratoires du lancement. L'environnement de vol SOYUZ-2/FREGAT a été programmé numériquement dans l'excitateur de vibrations, et piloté en boucle ouverte à l'aide d'un analyseur de signal dynamique HP 3562A avec un signal pour la génération et deux pour la mesure. Un boîtier métallique a été spécialement conçu pour recevoir le module LCS sur le banc d'essai. Les accélérations ont été enregistrées à l'aide de microsondes appliquées au sommet et au centre de la boîte contenant le LCS. L'excitateur de vibrations était calibré avant chaque essai. Les accélérations vibratoires aléatoires ont été divisées en deux phases de lancement : (i) une première phase de 120 secondes correspondant aux vibrations mécaniques des propulseurs du lanceur à l'allumage et au décollage (densité de puissance d'accélération : 0,02 g2/Hz sur une bande 20-300 Hz), et (ii) une deuxième phase de 480 secondes au cours de laquelle des ondes acoustiques apparaissent du fait de l'augmentation de la vitesse du lanceur (densité de puissance d'accélération : 0,05 g2/Hz sur une bande 100-1000 Hz). La fréquence et la densité spectrale des vibrations du test de qualification sont décrites dans le tableau 11. Après 600 secondes, le vaisseau spatial a été considéré en orbite basse (ligne de Kàrmàn autour de 100 km), l'action du propulseur a diminué, et les vibrations acoustiques se sont arrêtées. Le temps total pour un test de qualification complet (réglage, étalonnage, test, démontage) était d'environ une heure pour l'ensemble du triplicata expérimental.

***Tableau 11**. Paramètres de fréquences vibratoires du test de qualification du lanceur* Soyouz.

Operational phase	Duration (sec)	Frequency sub-band, Hz: 20–50	50–100	100–200	200–500	500–1000	1000–2000	Acceleration in g
		Spectral density g^2 / Hz						
Vehicle launch	120	0.02	0.02	0.02–0.05	0.05	0.05–0.025	0.025–0.013	7.42
	480	0.02	0.02	0.02	0.02–0.008	0.008–0.004	0.004–0.002	3.54

5.2.2.6 *Échantillonnage d'œufs du test de qualification de Soyouz*

Comme dans l'expérience de rotation orbitale, les échantillons pour le test *Soyouz* étaient en triplicata (n = 200 embryons/LCS). Les œufs ont été comptés manuellement, et la présence d'embryons a été vérifiée visuellement. Pour le bar européen, deux stades embryonnaires ont été testés à hpf 35 et hpf 83. La température d'incubation était de 13,1 °C pour le bar et de 18 °C pour le maigre. La température plus élevée pour le maigre était due à la spécificité de la zone de confort pour le développement de cette espèce. Ces températures sont couramment appliquées dans l'industrie (Mylonas *et al.*, 2013). Le protocole de l'expérimentation du test vibratoire de qualification pour un lanceur *Soyouz* est décrit en figure 25.

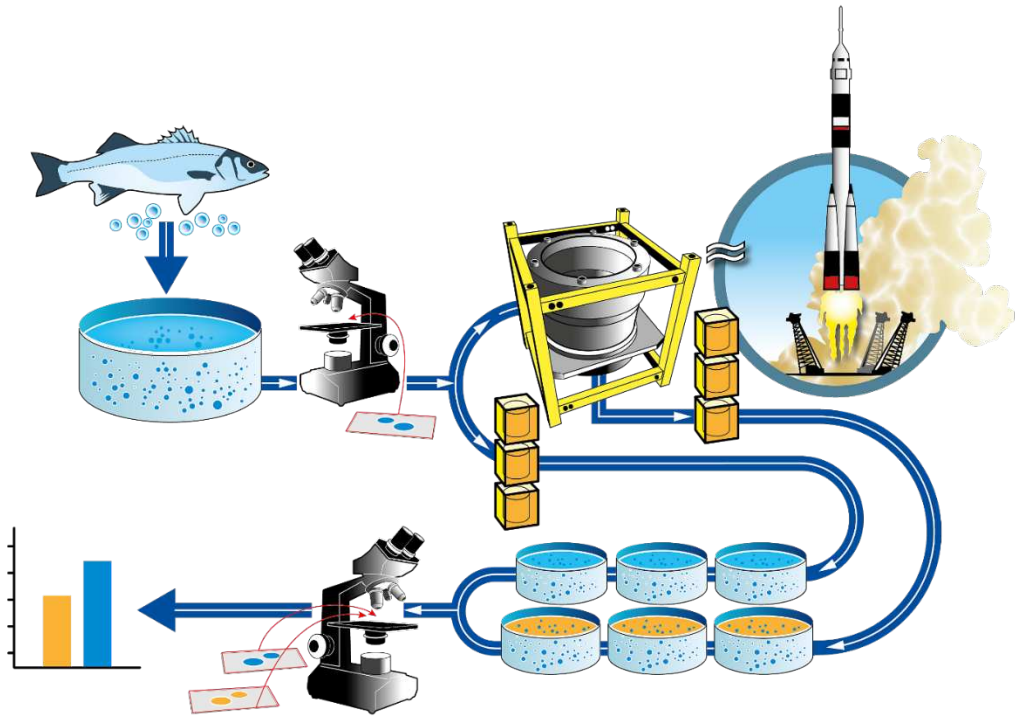


***Figure 25**. Protocole expérimental de la simulation de décollage* Soyouz *avec un triplicata de LCS exposé (orange) et triplicata de LCS témoin (bleu). Évaluation finale du taux d'éclosion après exposition de 10 min aux vibrations* Soyouz *(Przybyla* et al.*, 2020).*

5.2.2.7 *Évaluation du taux d'éclosion*

Pour les tests en rotation orbitale et de qualification vibratoire, le protocole d'évaluation du taux d'éclosion était le même. Pour les deux espèces, après la date théorique d'éclosion, chaque échantillon a été filtré avec une maille de 700 µm, et analysé visuellement pour détecter les jeunes larves à l'aide du même microscope binoculaire décrit précédemment. Pour l'expérience de rotation orbitale, le nombre de larves vivantes a été enregistré, et les résultats ont été traduits en pourcentage de larves vivantes :

$$\text{Hatching rate (\%)} = \frac{Live\ larvae}{Sample\ size}$$

L'expérience orbitale a montré que certains embryons considérés comme morts étaient en fait vivants dans l'enveloppe de l'œuf, mais non éclos. Ainsi, d'autres informations biologiques en plus des larves vivantes ont été recueillies dans l'expérience *Soyouz*. Les œufs ont été identifiés comme morts

(processus de développement embryonnaire définitivement arrêté) par leur couleur foncée, tandis que les œufs non éclos ont été identifiés par leur aspect translucide et la présence de l'embryon. Cette information a été enregistrée pour les expériences avec le bar européen à 35 hpf et 83 hpf, et avec le maigre à 14 hpf, et le taux d'éclosion a été calculé selon la formule :

$$\text{Hatching rate (\%)} = \frac{Live\ larvae}{(Live\ larvae + dead + unhatched)}$$

5.2.2.8 *Statistiques*

Pour chaque test (rotation orbitale et simulation *Soyouz*), le taux d'éclosion en pourcentage (p) a été normalisé en utilisant la formule $y = \arcsin\sqrt{p}$. Le test de normalité et de variance du jeu de données de l'expérimentation orbitale et de qualification *Soyouz* autorise l'utilisation du *t* test pour évaluer la significativité des résultats.

5.2.3 Résultats et discussion

5.2.3.1 *Test de rotation orbitale*

Dans ce test avec une centrifugeuse de laboratoire, des œufs de bar européen ont été centrifugés à 56 hpf et 71 hpf pendant 15 minutes à 250 tr/min. Aucune fuite n'a été observée dans le module LCS. Les œufs étaient en rotation dans la colonne d'eau dans le sens de rotation du dispositif. Ils étaient répartis de manière égale le long de la paroi du LCS ou du bécher. Les œufs à 56 hpf ont éclos 40 heures après le test, et les œufs à 71 hpf après 22 heures. Lorsque le module LCS a été ouvert, les œufs étaient en bon état. Après une période d'incubation dans un environnement RAS standard, les larves vivantes ont été comptées visuellement pour chaque échantillon : LCS, bécher ouvert et le témoin en LCS. Les résultats sont présentés dans la figure 26.

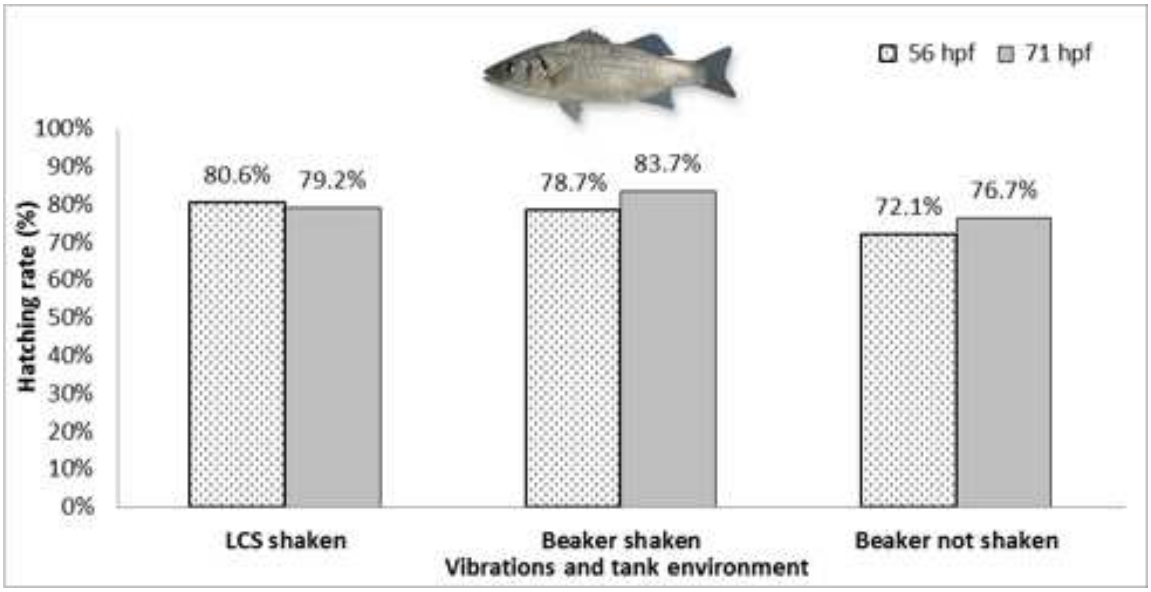


***Figure 26**. Taux d'éclosion de l'expérimentation en vibration orbitale. Résultats en pourcentages à hpf 56 et hpf 71 pour le module LCS exposé, le témoin en bécher et le module LCS témoin.*

Les taux d'éclosion des bars européens était compris entre 72,1 % et 83,7 % pour les trois échantillons. Cette fourchette peut être considérée comme normale, tombant dans la fourchette haute du taux d'éclosion dans des conditions industrielles. La structure globale du LCS et son montage sur le CubeSat ont préservé l'intégrité des œufs lors des forces multidirectionnelles appliquées en rotation orbitale. Ces résultats positifs nous ont permis de valider la possibilité d'expérimenter les vibrations sinusoïdales et aléatoires simulant un lancement *Soyouz*.

5.2.3.2 *Essai mécanique Soyouz*

Le bar européen

Pour les œufs de bar européen soumis à des vibrations d'un décollage de lanceur *Soyouz* à 35 hpf et 83 hpf, des éclosions ont été observées à 110 hpf pour les deux lots testés, malgré le fait que les œufs provenaient de lots de fécondation différents. En conséquence, nous pouvons calculer rétrospectivement que la simulation de lancement s'est produite respectivement à 32 % et 75 % du développement embryonnaire. Les vibrations aléatoires de cette simulation n'ont pas affecté l'intégrité des œufs de poissons.

Le taux d'éclosion du lot vibré à hpf 35 était de 75,8 % $\pm 4,0$ pour les échantillons testés dans le LCS, et de 82,1 % $\pm 3,5$ pour les échantillons témoins. S'agissant des matières biologiques résiduelles, les échantillons LCS ont révélé que 21,8 % $\pm 4,4$ des œufs étaient morts et que 2,6 % $\pm 0,5$ n'étaient pas éclos, tandis que dans les échantillons témoins, 17,5 % $\pm 3,2$ des œufs étaient morts et 1,8 % $\pm 0,7$ n'étaient pas éclos. Aucune différence significative n'a été observée pour ces paramètres entre les traitements.

Au stade embryonnaire le plus tardif (83 hpf), le taux d'éclosion était de 92,9 % $\pm 1,8$ pour les échantillons LCS et de 96,7 % $\pm 2,4$ pour les échantillons témoins. Aucune différence significative n'a été observée entre les lots exposés et témoins. Les résultats sont présentés dans la figure 27.

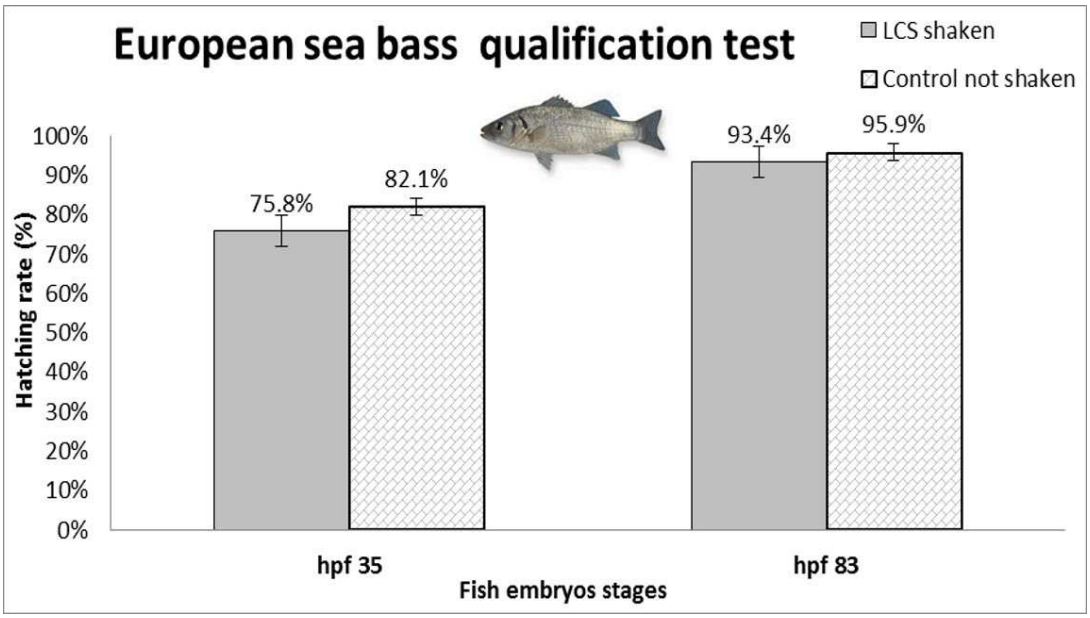


***Figure 27**. Taux d'éclosion du bar européen après simulation d'un lancement* Soyouz *(test de qualification standard – 10 min) sur des embryons au stade de développement 35 hpf et 83 hpf pour des conditions testées en triplicata : module LCS vibré et un LCS témoin non vibré.*

Le maigre

Chez le maigre, la période d'incubation est physiologiquement plus courte que celle du bar européen. Pour le test *Soyouz* sur œufs à 14 hpf, le temps d'éclosion a été observé à 37 hpf. Au moment de l'exposition aux vibrations du lancement, le développement était donc à 38 % du stade embryonnaire. Le taux d'éclosion est présenté à la figure 28.

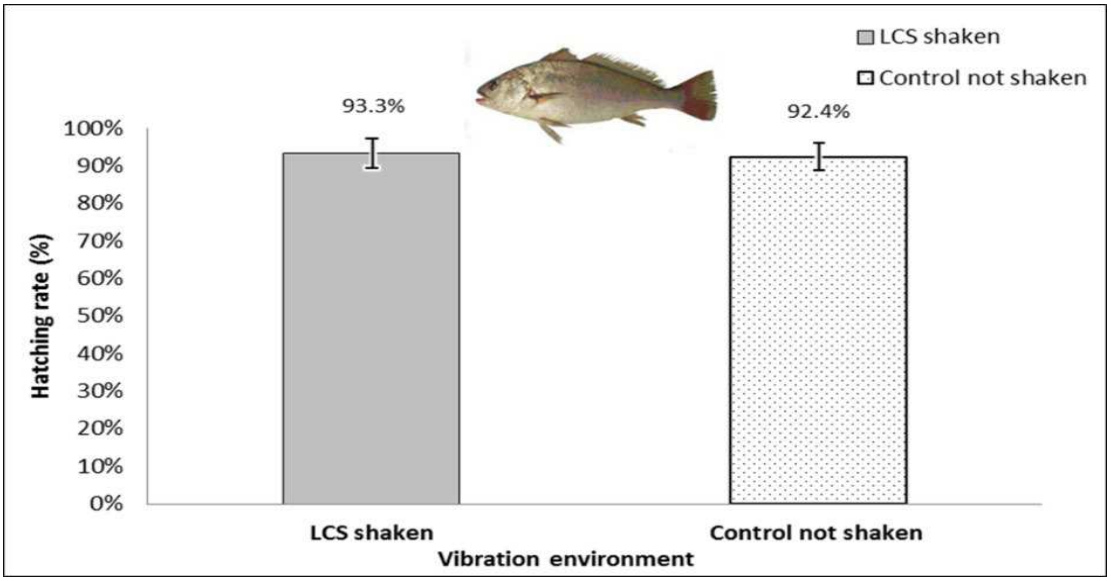


***Figure 28.** Taux d'éclosion du maigre après une simulation de lancement* Soyouz *(test de qualification standard – 10 min) sur des embryons à 14 hpf testés en triplicata : module LCS vibré et un LCS témoin non vibré.*

Le taux d'éclosion du maigre était de 95,3 % $\pm 6{,}3$ pour les échantillons testés dans le LCS et de 92,4 % $\pm 6{,}2$ pour les échantillons témoins. S'agissant des matières biologiques résiduelles, les échantillons LCS ont

révélé que 6,3 % ± 4,1 des œufs étaient morts et que 2,6 % ± 0,5 n'étaient pas encore éclos, tandis que dans les échantillons témoins, 6,4 % ± 5,2 des œufs étaient morts et 1,8 % ± 0,8 n'étaient pas éclos. Aucune différence significative n'a été observée pour ces paramètres.

Discussion

Les organismes marins et les poissons ont été la première forme de vie sur Terre dans les océans orageux (Quinton, 1912). La stratégie de reproduction des poissons a permis aux organismes au stade embryonnaire de survivre aux forces hydrauliques appliquées aux cours d'eau. Indépendamment de l'espèce, du stade ou de la physiologie embryonnaire, nos résultats ont démontré que les œufs de poissons présentent une bonne résistance à un test industriel de qualification aux vibrations du lanceur *Soyouz*, qui propose l'environnement le plus extrême des lanceurs actuels. Ces résultats pourraient s'expliquer par la protection naturelle que procure le chorion des embryons face à des conditions extrêmes. Contrairement aux œufs de volailles ou aux embryons de mammifères, les œufs de poissons en pleine mer sont soumis à des mouvements violents dans des directions aléatoires. L'embryon de poisson est protégé des contraintes mécaniques telles que les chocs et les vibrations acoustiques par le chorion. Celui-ci est constitué d'une enveloppe cellulaire (3-4 µm) entourant les œufs matures. Il est composé de plusieurs couches protectrices de glycoprotéines spécifiques. Cette structure joue aussi un rôle dans la production d'immunogènes pendant l'incubation (Scapigliati *et al.*, 1994). Les glycoprotéines chorioniques ayant un rôle protecteur sont synthétisées dans le foie des parents (Saavedra *et al.*, 2016).

Notre étude indique que le taux d'éclosion des bars européens et des maigres exposés à la simulation de lancement ne diffère pas des performances sur Terre. Le taux d'éclosion et la durée de l'embryogenèse étaient similaires à ceux observés dans des conditions d'élevage commercial sans stress vibratoire du lanceur. Dans notre étude, le stade le plus précoce que nous ayons pu tester pour les deux espèces correspond à 30 % du développement total de l'embryon. Pour un vol lunaire, la période d'incubation doit être calée sur la durée du voyage (3 à 6 jours selon le plan de vol). L'éclosion était prévue au BLSS sur la Lune pour éviter l'intervention humaine pendant le vol. Nos résultats ont montré que le bar européen éclot 110 heures après la fécondation (4,5 jours), ce qui fait de cette espèce aquacole un candidat potentiel pour l'aquaculture lunaire. Les embryons pourraient être placés en hypophysiologie dans le but de retarder l'éclosion pendant 1 ou 2 jours (Soyano and Mushirobira, 2018). Si les résultats sur les œufs de maigre sont aussi un succès, ceux-ci éclosent environ 37 heures après la fécondation, soit 1,5 jour après le décollage théorique. Or, le vol vers la Lune ne pouvant être réalisé qu'en 4,5 jours au minimum, cette durée d'embryogénèse disqualifie le maigre si on prend en considération le fait qu'il faut programmer l'éclosion après l'arrivée sur la Lune. Lors d'une mission lunaire, il est également important de considérer la logistique au sol avant le décollage de la fusée, comme la durée d'embarquement et le risque de retard dans la fenêtre de lancement (en raison du compte à rebours, de la météo défavorable…), pour s'assurer une marge de sécurité en cas de report du lancement.

5.2.4 Conclusion

Deux conclusions substantielles ressortent de notre étude. Premièrement, les deux espèces aquacoles ont la capacité de résistance permettant d'éclore après le lancement d'un vaisseau spatial, avec un succès d'éclosion comparable aux observations de l'industrie aquacole intensive. Deuxièmement, quel que soit le stade de vie embryonnaire après le tiers du développement, les embryons résistent à un test de qualification pour un vol spatial. Cependant, l'exposition à un stade très précoce (avant 27 hpf) après la fécondation doit être testée. Ces résultats préliminaires encourageants confirment notre intuition et

notre hypothèse que la forme aquatique peut s'adapter à un environnement extrême comme un lancement spatial. Ainsi, alors que nos résultats indiquent que le bar européen et le maigre pourraient résister aux conditions de lancement, les futures expériences doivent étudier l'intégrité des embryons et des larves dans un environnement spatial au-delà du lancement. Une telle étude devrait se concentrer sur la résistance des embryons de poissons à l'adaptation à l'hypergravité (accélération du lanceur), à la microgravité et à la dose de rayonnements particulaires chargés (neutrons/protons) secondaires acceptable pour un développement larvaire normal jusqu'à la première alimentation (environ 5 jours après l'éclosion pour le bar européen). Ces recherches pourraient faire du poisson le premier animal élevé et consommé hors de la Terre, ainsi que le premier vertébré à naître sur la Lune.

5.3 Influence de l'hypergravité et de la microgravité sur l'embryogenèse d'un poisson d'aquaculture

5.3.1 Introduction

Afin de préparer une véritable mission spatiale avec des embryons piscicoles, la faisabilité du concept doit être testée. Durant des expérimentations simulées sur Terre, des embryons de poissons doivent être exposés et étudiés sous l'angle des divers environnements rencontrés lors d'une mission lunaire. Dans le cadre du programme LUNAR HATCH, une première expérience a été réalisée pour étudier l'impact des vibrations des fusées sur l'embryogenèse du bar européen et du maigre (voir le paragraphe 5.2). Les résultats n'ont montré aucune différence significative sur le taux d'éclosion des œufs pour les deux espèces après un test de qualification *Soyouz*, quel que soit le stade de développement de l'embryon (Przybyla *et al.*, 2020).

Une deuxième expérimentation, en simulation au sol, avec le bar européen comme poisson d'aquaculture modèle, a été réalisée. L'objectif en était de mesurer l'influence des gravités altérées lors du lancement (hypergravité $\Delta g>1$ g) ou de la mise en orbite (microgravité $\Delta g<1$ g), afin de poursuivre les investigations sur la faisabilité d'une telle mission (Przybyla et al., 2023).

5.3.1.1 *Embryons de poissons en hypergravité*

Durant la phase de décollage d'un lanceur, qui dure 10 minutes avant que celui-ci soit en orbite, l'accélération appliquée à son chargement pourrait être de $3 g<\Delta g<5$ g selon la puissance de propulsion du lanceur. Le degré d'accélération varie en fonction de la vitesse du lanceur, du carburant consommé par le moteur et de la masse de la fusée.

À ce jour, la connaissance acquise sur l'influence d'une hypergravité sur des embryons de poissons est issue essentiellement d'essais en centrifugeuse, et non de missions spatiales. Une étude sur les larves de poissons cichlidés d'aquaculture (*Oreochromis mossambicus*) et les juvéniles du porte-épée (*Xiphophorus hellerii*) a enregistré le comportement, le tissu neuronal et les otolithes des poissons, concluant que ceux-ci ont une perception en hypergravité (Brungs *et al.*, 2011). Dans un environnement permanent de 3 g, les poissons développés ont montré une légère inclinaison latérale pendant la nage, probablement en raison de la croissance asymétrique des otolithes (Hilbig and Anken, 2017). Cependant, l'influence de l'hypergravité sur le développement des embryons de poissons est peu documentée. Des recherches sur la formation des otolithes appartenant à des embryons de poisson-zèbre (*Danio rerio*) ont été entreprises à 3 g pendant 7 jours. Dans le groupe témoin, 16 heures après la fécondation à 1 g, des précurseurs des otolithes ont été observés. Les poissons-zèbres élevés à 3 g de 1 à 7 jours après la fécondation ont présenté une croissance des otolithes significativement plus lente que les témoins à 1 g (Wiederhold *et al.*, 2003). À 24 hpf, une diminution de la pigmentation a été observée lorsque les œufs de poissons-zèbres fécondés étaient sous une gravité de 3 g. Un jour plus tard, la différence avec le lot témoin resté à 1 g avait disparu (Aceto *et al.*, 2015). Une étude avec des œufs et des post-larves de poissons-zèbres de moins de 7 jours soumis à une exposition de 3 g a montré des changements dans leurs schémas de nage et de flottaison. L'éclosion a mis au jour un retard significatif de 2 à 3 jours. De plus, l'hypergravité à long terme impacte l'expression des gènes impliqués dans les mécanismes épigénétiques (Salazar Moscoso *et al.*, 2022). La recherche médicale a appliqué l'hypergravité à long terme (plusieurs jours) à des poissons d'aquarium pour mieux comprendre la physiologie adaptative de

ce vertébré. Or, dans une mission spatiale réelle, cet environnement ne dure que 10 minutes, le temps d'atteindre l'orbite basse terrestre. Par conséquent, une durée plus courte de 10 minutes d'hypergravité a été utilisée pour notre étude sur le bar européen.

5.3.1.2 *Embryons de poissons en microgravité*

Lorsque $\Delta g<1$ g, les organismes sont en microgravité. Dans une mission spatiale en orbite basse (Low Earth Orbite, LEO), la gravité est de 10^{-3} g$<\Delta g<10^{-5}$ g (Black *et al.*, 1995), alors que sur la Lune, elle est de $\Delta g=0{,}166$ g. Dans la recherche médicale, des poissons à l'état de larves ou de juvéniles ont été utilisés comme modèles en LEO pour étudier le développement du système vestibulaire et de l'otolithe afin de mieux comprendre l'oreille interne humaine (Anken *et al.*, 2016). Des expériences ont été menées sur la Terre pour simuler la microgravité à l'aide d'une tour de chute et de vols paraboliques (Anken and Hilbig, 2009; Anken et al., 1998; Endo et al., 2002). En laboratoire, il est possible d'expérimenter la microgravité en clinostat ou avec une machine rotative appelée RPM, ou *random positionning machine* (Brungs et al., 2011; Edsall and Franz-Odendaal, 2014).

La vie multicellulaire est apparue sur Terre il y a environ 2 milliards d'années. La gravité sur Terre était de 1 g, influençant le développement phylogénique des organismes vivants. Comparés aux vertébrés terrestres, les organismes aquatiques sont soumis à une force gravitationnelle et à une force de flottabilité opposées à la gravité terrestre (l'effet dit « de bouée »). Il en résulte qu'un organisme aquatique immergé ressent un poids corporel réduit par rapport à un organisme terrestre. C'est la raison pour laquelle les astronautes s'entraînent dans des piscines, ou simulent des activités extravéhiculaires en milieu marin (Trout and Bruchey, 1969). L'environnement aquatique suggère que parmi les situations de gravité altérée, le développement embryonnaire des poissons pourrait être moins affecté par la microgravité que par l'hypergravité.

5.3.1.3 *Récepteurs glucocorticoïdes et leurs protéines chaperonnes Hsp90α*

Le cortisol, une hormone stéroïde appartenant à la famille des glucocorticoïdes, est impliqué dans la régulation de divers mécanismes physiologiques, notamment l'inflammation, le métabolisme et la réponse au stress. Chez les poissons, comme chez beaucoup d'autres vertébrés, il est considéré comme l'hormone du stress (Sadoul and Geffroy, 2019). Il se lie aux récepteurs glucocorticoïdes (GR) et aux récepteurs minéralocorticoïdes pour activer ou inhiber un certain nombre de gènes, contribuant ainsi à l'adaptation physiologique après le stress. Le bar européen possède deux de ces récepteurs glucocorticoïdes : GR1 et GR2. L'expression des gènes codant pour ces protéines a été détectée précocement dans le développement d'un individu chez l'espèce, et utilisée comme marqueur de stress dans diverses études (Di Bella et al., 2008; Geffroy et al., 2021; Pavlidis et al., 2011; Tsalafouta et al., 2014).

Les protéines de choc thermique sont impliquées dans le développement animal (Rutherford and Lindquist, 1998), ainsi que dans la réponse au stress des poissons (Palmisano *et al.*, 2000). Chez le bar européen, Hsp90α est une protéine chaperonne pour GR1 et GR2, et joue un rôle clé dans la régulation de la disponibilité des GR pour le cortisol. L'activité de Hsp90α a principalement été décrite lors d'expériences de stress liées à l'exposition à des températures chaudes, y compris chez le bar (Goikoetxea *et al.*, 2021) et chez la daurade royale *Sparus aurata* (Madeira *et al.*, 2016). L'activité de GR1, GR2 et Hsp90α au cours d'expériences de gravité altérée peut nous donner des informations utiles

sur le développement et le niveau de stress des larves écloses en microgravité ou après avoir été soumises à un environnement d'hypergravité de 10 minutes au cours du développement embryonnaire.

5.3.1.4 *Système immunitaire inné : composant du complément protéine C3 et interleukine-1β*

Les embryons et les larves de poissons disposent d'un système de défense efficace pour faire face aux agents pathogènes aquatiques, bien qu'ils n'aient pas (à ce stade) de système immunitaire adaptatif avec mémoire, et donc spécifique à l'individu. L'immunité adaptative devient fonctionnelle à un stade de développement ultérieur. Pour reconnaître et détruire efficacement les agents pathogènes à un stade précoce de développement, le système immunitaire inné (sans mémoire et non spécifique) est activé par différentes voies (Magnadóttir, 2006; Uribe et al., 2011). L'élément clé du système immunitaire inné chez le poisson est la protéine du composant 3 du complément (C3), qui joue un rôle central dans les voies lytique et pro-inflammatoire (Najafpour et al., 2020; Yano et al., 1988). Cette protéine a été identifiée dans le système digestif des larves de flétan de l'Atlantique (*Hippoglossus hippoglossus L*.) dès le début de la première alimentation, et 50 jours après l'éclosion (Hermannsdottir *et al.*, 2009). Il a également été démontré que les protéines du complément sont impliquées dans la régénération des tissus et des organes. Il a été démontré que des voies distinctes déclenchées par le complément modulent les réponses critiques qui favorisent la reprogrammation, la formation de motifs et la régénération des tissus tout au long de la phylogenèse (Mastellos *et al.*, 2013). Ainsi, la protéine C3 pourrait fournir des informations sur le développement du système immunitaire non spécifique dans des conditions de gravité altérée, en supposant que les changements environnementaux peuvent avoir un impact sur cela.

L'expression de l'interleukine-1β (IL-1β) a été signalée dans plusieurs études sur des vertébrés pendant les vols spatiaux (Buchheim et al., 2019; Crucian et al., 2014; Krieger et al., 2021). L'IL-1β est un initiateur de l'inflammation, et son expression chez les vertébrés peut aussi être une réponse au stress (Brydon et al., 2005; Serradell et al., 2020). L'IL-1β a été étudiée chez 13 espèces de poissons téléostéens, et elle semble fonctionner de la même manière que chez d'autres vertébrés, y compris les mammifères (Uribe *et al.*, 2011). Étant donné que l'inflammation ou le stress peut causer des lésions tissulaires affectant divers organes et systèmes physiologiques des poissons, dans notre étude, nous avons quantifié les transcrits IL-1β pour déterminer si la gravité altérée simulée a un impact sur l'expression de ce gène immunitaire inné dans le développement embryonnaire de *Dicentrarchus labrax*.

Notre étude s'est aussi concentrée sur le taux d'éclosion et la consommation d'oxygène des œufs de poissons d'aquaculture au cours d'une expérience au sol simulant l'hypergravité à l'aide d'une centrifugeuse, ainsi que la microgravité à l'aide d'une machine de positionnement aléatoire (RPM). Les paramètres étudiés après l'exposition à une gravité altérée étaient le facteur d'intégrité de l'ARN (RIN), l'expression relative des récepteurs glucocorticoïdes (GR1, GR2) et Hsp90α afin d'évaluer le niveau de stress dans les conditions d'une mission spatiale réelle. L'étude des transcrits C3 et IL-1β visait à évaluer l'état précoce du système immunitaire après une exposition aux deux conditions modifiées juste après l'éclosion, donc à l'état de pré-larve. L'objectif de cette étude était de jeter les bases d'une preuve de concept de la faisabilité de l'éclosion de poissons d'aquaculture en orbite basse ou sur une future base lunaire, et d'anticiper les éventuelles contre-mesures qui pourraient devoir être mises en œuvre pour le bien-être des poissons au cours d'une telle mission.

5.3.2 Matériels & méthodes

L'exposition d'embryons de *Dicentrarchus labrax* issus de la même fratrie à des conditions simulées de microgravité et d'hypergravité a été réalisée dans une plateforme expérimentale de l'Agence spatiale européenne (ESA) à Nancy, en France. Les salles expérimentales pour les deux gravités étaient séparées, avec un groupe d'embryons témoins dans chaque pièce. Afin d'évaluer le taux d'éclosion et de comparer la viabilité des poissons, un élevage de la fratrie en triplicata a été maintenu en parallèle, dans des conditions optimales (dites « industrielles »), à la station de recherche aquacole de l'Ifremer (Palavas-les-Flots, France). Le visuel du protocole expérimental est présenté à la figure 29.

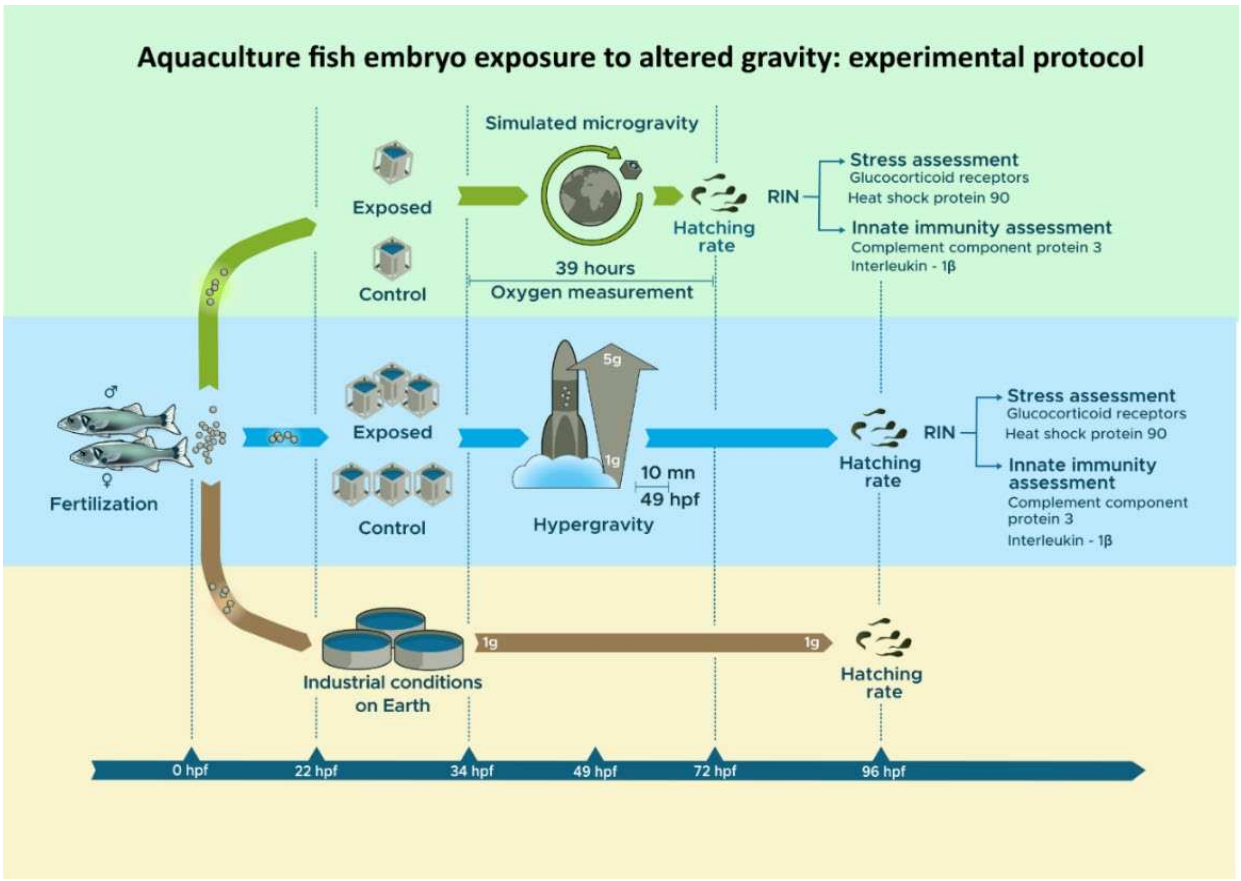


***Figure 29**. Protocole expérimental d'exposition à la microgravité (vert), à l'hypergravité (bleu), et conditions industrielles (marron), de la fertilisation du* Dicentrarchus labrax *à l'analyse du taux d'éclosion et l'échantillonnage pour analyse de transcrits de gènes de stress et d'immunologie.*

5.3.2.1 *Enceinte expérimentale*

Pour mener l'expérimentation, un mini-bassin expérimental en polychlorure de vinyle a été construit à l'intérieur d'un CubeSat sur les plans de celui utilisé dans le chapitre 5.2 (Przybyla *et al.*, 2020).

Les groupes expérimentaux ont ensuite été enfermés hermétiquement dans les CubeSats, et les groupes témoins ont été eux aussi enfermés à une densité de 0,43 œufs/mL, dans des bouteilles de même contenance, étanches, sans possibilité de renouveler l'eau ou d'injecter de l'oxygène.

5.3.2.2 *Fertilisation des œufs de poissons expérimentaux*

Une semaine avant l'expérience, 4 mâles et 4 femelles *Dicentrarchus labrax* ont été sélectionnés à la station de recherche aquacole de l'Ifremer. Ils ont ensuite été isolés dans un RAS régulé à 13,2 °C. Deux jours avant la date de la fécondation prévue, les femelles ont reçu une injection d'hormone de libération des gonadotrophines (10 µg/mL). Le jour de la fécondation, elles étaient prêtes pour la collecte des œufs. Un seul mâle et une femelle avec la meilleure qualité ovocytaire ont été sélectionnés pour une fécondation contrôlée afin de produire une seule famille pour l'expérience d'hypergravité (HGE) et de microgravité simulée (SMGE), pour minimiser l'influence de la variabilité génétique parentale sur l'ensemble des résultats. Un volume de 2 mL d'ovocytes (n≈2000) a été échantillonné et placé dans un petit bécher de 150 mL. La qualité des ovocytes a été évaluée au microscope, puis ceux-ci ont été recouverts avec 1 mL de sperme frais. Les œufs fertilisés ont ensuite été placés dans un incubateur aquatique à 14,5 °C, pH ≈ 8,15 et salinité ≈ 38 %. Des œufs viables ont été prélevés pour être échantillonnés pour l'expérimentation.

5.3.2.3 *Échantillonnage des lots d'embryons expérimentaux*

À 20 hpf, les œufs de poissons (taille ≈ 1,1 mm) étaient transparents, et le dôme embryonnaire était facilement visible sans agent clarifiant. En raison de la présence possible d'œufs morts (qui sont de couleur brune), tous les œufs ont été sélectionnés visuellement par le même opérateur à l'aide d'un microscope binoculaire (Motic-w10x20). Au total, 1 025 œufs de bar européen ont été évalués, comptés et préparés pour constituer un pool pour les deux expériences. Tous les CubeSats et bouteilles étaient remplis d'eau filtrée (0,2 µm) sursaturée en oxygène (240 % de la saturation de l'air).

5.3.2.4 *Transport des lots expérimentaux du laboratoire Ifremer à la plateforme expérimentale gravitationnelle pour modèles animaux (GEPAM) de l'ESA*

À 22 hpf, tous les groupes destinés aux expériences de gravité altérée (sauf l'élevage témoin industriel) ont été transférés sur la plateforme GEPAM (Bonnefoy *et al.*, 2021), dans un véhicule thermorégulé à 16 °C. Les groupes expérimentaux, les témoins expérimentaux et l'équipe scientifique ont atteint la plateforme expérimentale gravitationnelle après un voyage d'environ 7 heures (figure 30).

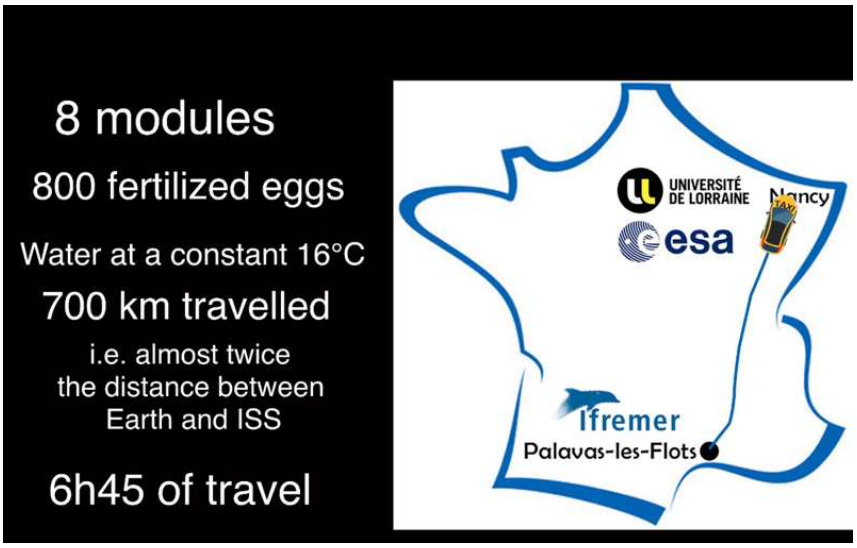


***Figure 30**. Transfert des lots d'embryons destinés aux expérimentations de gravité altérée sur la plateforme GEPAM de l'ESA à Nancy (©V.Ribière).*

5.3.2.5 *Mesure de l'oxygène à l'intérieur du CubeSat expérimental*

Le taux de consommation d'oxygène des embryons est difficile à mesurer, en raison de la petite taille des œufs et des faibles taux d'absorption d'oxygène. La concentration d'oxygène à l'intérieur des modules CubeSats a été régulièrement mesurée à l'aide de la technologie non invasive utilisant une fibre optique. Cette méthode évite d'ouvrir le CubeSat scellé, action qui risquerait de provoquer un dégazage de l'oxygène et donc de fausser les mesures. De plus, elle préserve les embryons de poissons d'un éventuel stress dû à la mesure elle-même. En plaçant le bord de la fibre devant le capteur (figure 31E), le transmetteur est capable d'analyser le signal reçu et de le traduire en un taux d'oxygène (en % de saturation de l'air) lisible directement par le logiciel Presens FiBox (figure 31F). Un étalonnage est nécessaire avant la mesure, en utilisant de l'eau Milli-Q à 0 % et 100 % de saturation en oxygène. La température du module a été enregistrée pour chaque mesure, car elle influence le calcul de la concentration en oxygène. Tous les modules ont été remplis à 22 hpf avec la même eau de mer à salinité constante (34,8 PSU). Une mesure avec de l'eau filtrée (0,2 µm pour éviter la présence de bactéries et leur respiration) et sans embryons a montré que les CubeSats perdaient environ 15 % d'oxygène, probablement à cause d'un joint poreux. Cette perte a été prise en compte dans le calcul de la consommation d'oxygène. La mesure initiale d'oxygène a été effectuée dans tous les lots expérimentaux, juste après que le module CubeSat a été scellé hermétiquement à 22 hpf.

La consommation d'oxygène embryonnaire a été calculée selon la formule suivante :

A : [Perte biologique d'oxygène] (μgO_2)

$$\Delta[O2]\ 22\ \text{hpf} - 70\ \text{hpf} - (\Delta[O2] * 15\%)\ \text{mechanical loss} * 0.23\ \text{CubeSat volume}$$

B: [Nombre d'heures écoulées depuis l'étanchéité de CubeSat]

$$\Delta 22\ \text{hpf} - 70\ \text{hpf}$$

La consommation d'oxygène pendant l'expérience de microgravité (μgO_2 / œufs / h) a été calculée avec A / B.



***Figures 31**. (**A**) (**B**) Mini-bassin expérimental (230 ml) à l'intérieur d'un CubeSat (n = 100 œufs) utilisé dans cette expérience, ainsi que dans les expériences précédentes (voir paragraphe 5.2), pour évaluer l'impact des vibrations de lancement de fusée sur le taux d'éclosion des poissons d'aquaculture. (**C**) Rotor aquatique (de 1 g à 5 g) avec réservoirs expérimentaux en triple exemplaire contenant des embryons de bar européen (n = 100 chacun). (**D**) Machine de positionnement aléatoire avec un CubeSat contenant des embryons de bar européen (n = 100) exposés pendant 39 heures de microgravité simulée et le CubeSat de contrôle (n = 100). (**E**) Sonde d'oxygène PSt3 et lumière transmise par la fibre optique au point du capteur pour mesurer la concentration en oxygène à l'intérieur de la fenêtre CubeSat. (**F**) Transfert des données sur la concentration en oxygène vers l'ordinateur.*

5.3.2.6 *L'exposition en microgravité simulée*

La salle d'exposition en microgravité simulée a été maintenue à $18{,}1^{\pm 0{,}8}$ °C à l'aide d'un système de climatisation de l'air ambiant. À 34 hpf, un CubeSat a été rempli de 230 ml d'eau de mer (densité 1,026 kg.m$_3$, viscosité 1,13 mPa.s) et de 100 œufs (mesurant chacun ≈ 1,1 mm). Le bassin est fixé au centre entre les bras d'une machine de positionnement aléatoire (RPM) fabriquée par Dutch Space BV (figure 31D). Un RPM est un clinostat 3D couramment utilisé pour simuler la microgravité au sol. Une étude de Herranz *et al.* (2013) a indiqué qu'un RPM pouvait être utilisé avec les stades larvaires des poissons avant qu'ils puissent nager librement, ce qui était le cas ici. Le régime a été réglé pour tourner en « mode aléatoire complet » dans une direction et un intervalle aléatoire, avec une vitesse angulaire comprise entre 55 et 65 degrés par seconde pendant 39 heures. Le changement aléatoire continu d'orientation génère des effets similaires à ceux de la microgravité réelle dans l'espace en annulant la force g terrestre. Cet appareil est fréquemment utilisé pour des simulations au sol, et reste décrit comme la meilleure simulation possible (Hemmersbach *et al.*, 2018). Au cours de l'expérience de microgravité, le RPM a été arrêté 3 fois pendant moins de 5 minutes pour mesurer les niveaux de concentration d'oxygène avec le dispositif de fibre optique. Les mesures d'oxygène ont été effectuées à la mise en microgravité, à 56 hpf (c'est-à-dire au milieu de l'expérimentation) et à la fin de l'exposition en microgravité.

Le CubeSat utilisé comme témoin a été préparé de la même manière que celui exposé aux conditions RPM. Il contenait 100 œufs au même stade de développement, et a été placé dans la même salle expérimentale, avec un éclairage et une climatisation contrôlés identiques.

Une fois les œufs éclos, les modules exposés et témoins ont été ouverts pour compter les larves, qui ont été échantillonnées pour l'analyse des biomarqueurs de stress et d'immunité innée. Les taux d'éclosion des deux CubeSats ont été évalués à 72 hpf.

Il est à noter que les machines de positionnement aléatoire (RPM) présentent certaines limites par rapport à l'exposition réelle dans l'espace, notamment parce que l'altération de la gravité est focalisée sur le centre de rotation. Cependant, dans notre expérience, le rayon de la sphère utilisée comme réservoir d'œufs à l'intérieur du CubeSat était très petit (3 cm) et bien centré entre les bras. Les œufs eux-mêmes sont sphériques, et leur mouvement à l'intérieur du réservoir sphérique pendant l'exposition RPM peut être comparé à une sorte de machine de loterie à boules. Bien que nous ne puissions pas calculer avec précision la quantité de gravité résiduelle, nous pouvons considérer que tous les œufs avaient la même probabilité de passer du temps de résidence au centre du RPM. Le mouvement 3D favorise le mélange au centre du CubeSat, ce qui permet aux embryons d'avoir la même exposition à une gravité altérée au cours des 39 heures de l'expérience.

5.3.2.7 *L'exposition en hypergravité*

Le rotor aquatique (étanche en cas de fuites d'aquarium) de l'installation GEPAM comporte huit nacelles (figure 31C) qui ont suffisamment d'espace pour accueillir un CubeSat. À 49 hpf, un triplicata de CubeSats (n = 100 embryons chacun) a été placé dans des gondoles non consécutives afin d'équilibrer le dispositif de centrifugation. L'accélération choisie pour ce test était de 5 g, ce qui est légèrement supérieur à *SLS-Artemis 1* et à toutes les missions *Apollo* précédentes (tableau 12).

***Tableau 12**. Accélération des lanceurs lunaires américains en unité de gravité g.*

Apollo 7	Apollo 8	Apollo 9	Apollo 10	Apollo 11	Apollo 12	Apollo 13	Apollo 14	Apollo 15	Apollo 16	Apollo 17	Artemis 1
4.28	3.96	3.85	3.92	3.94	3.91	3.83	3.82	3.97	3.82	3.87	4.1

Le triplicata expérimental a été exposé pendant 10 minutes (durée pour atteindre l'orbite basse) dans la centrifugeuse, et le groupe témoin triple a été placé dans la même pièce. Après exposition, les groupes ont été placés dans une chambre thermorégulée ($14{,}8^{\pm 1{,}6}$ °C) jusqu'à la fin de l'embryogenèse et à l'évaluation du taux d'éclosion.

5.3.2.8 *Évaluation du taux d'éclosion et échantillonnage post-exposition*

Dans les deux expériences de gravité altérée, les éclosions sont apparues la nuit. Le comptage pour mesurer le taux d'échantillonnage et le prélèvement de biomarqueurs ont eu lieu environ 4 heures après l'éclosion dans l'expérience de microgravité simulée (à 96 hpf) et dans l'expérience d'hypergravité (à 72 hpf). La différence entre les deux périodes d'éclosion est directement corrélée avec la différence de température ambiante à l'intérieur des deux salles expérimentales, influençant la température à l'intérieur du CubeSat.

Le protocole d'évaluation du taux d'éclosion est décrit dans Przybyla *et al.* (2020). Les pré-larves ont été échantillonnées et fixées afin d'évaluer l'intégrité de l'ARNm (RIN), ainsi que l'expression relative de GR1,

GR2, Hsp90α, C3 et IL-1β. Étant donné le stade de développement très précoce, les échantillons consistaient en un pool de plusieurs pré-larves.

Pour l'expérience d'hypergravité, 20 pré-larves ont été échantillonnées dans chacun des CubeSats exposés et témoins (n = 6). Pour l'expérience de microgravité, en raison du fait qu'un seul CubeSat pouvait être attaché au RPM, la disponibilité des œufs pour analyses était plus limitée. En conséquence, trois aliquotes de 5, 10 et 15 pré-larves ont été prélevées sur le seul CubeSat exposé à la microgravité simulée et sur le CubeSat témoin. Tous les échantillons ont été congelés dans de l'azote liquide, et stockés à -80 °C pour une extraction ultérieure de l'ARN. Le plan d'échantillonnage est décrit au tableau 13.

Tableau 13*. Plan d'échantillonnage pour l'analyse des biomarqueurs de stress et immunologie innée. Une seule aliquote a été prélevée sur chaque CubeSat exposé à l'hypergravité (HG1 ; HG2 ; HG3) et sur chaque CubeSat témoin. Pour l'expérience de microgravité simulée, trois aliquotes ont été prélevées sur le seul CubeSat (MG1) exposé à la microgravité et sur le contrôle.*

Experiment	CubeSat	Pre-larvae per sample	
		Exposed	Control
Hypergravity (6 CubeSats) Three exposed and three control	HG1	20	20
	HG2	20	20
	HG3	20	20
Simulated microgravity (2 CubeSats) One exposed and one control	MG1.1	5	5
	MG1.2	10	10
	MG1.3	15	15

5.3.2.9 *Extraction et transcription inverse de l'ARN total à partir d'échantillons de poissons*

L'ARN total a été extrait des larves soumises à toutes les conditions de gravité à l'aide du kit Nucleospin® RNA Plus XS (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). L'analyse de l'intégrité de l'ARN a été réalisée à l'aide de bandes d'ARN ScreenTapes et d'un dispositif TapeStation 4150 (Agilent, Santa Clara, Californie, États-Unis). Pour chaque échantillon, 200 ng d'ARN total ont été transcrits à l'aide d'amorces aléatoires, de dNTP, de RNaseOut et de transcriptase inverse MML-V (tous provenant d'Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) en suivant les instructions du fabricant.

5.3.2.10 *PCR quantitative (qPCR)*

Des PCR quantitatives ont été réalisées en double pour un triple échantillon en utilisant Takyon No ROX SYBR MasterMix dTTP Blue (Eurogentec, Liège, Belgique) et un système Mastercycler Realplex2 Real-Time PCR (Eppendorf, Hambourg, Allemagne). Les amorces (Eurogentec, Liège, Belgique) utilisées pour amplifier les transcrits ont été conçues dans différents exons ou dans des jonctions entre exons pour empêcher l'amplification de traces potentielles d'ADN génomique. La spécificité de l'amorce a été vérifiée à l'aide de l'outil de recherche d'alignement local de base (BLAST) du National Center for Biotechnology Information des États-Unis (Bethesda, Maryland, États-Unis). Le programme de cycles qPCR était de 5 minutes à 95 °C, suivis de 40 cycles de 15 secondes à 95 °C et de 45 secondes à la température de

recuit indiquée dans le tableau 14. L'efficacité de l'amplification a été associée à des courbes standard, et validée dans la plage de 89 % à 100 %. La stabilité des transcriptions a été vérifiée à l'aide du logiciel BestKeeper (Pfaffl, 2001). L'expression relative des récepteurs glucocorticoïdes 1 et 2 (GR1, GR2), Hsp90α, C3 et IL-1β a été normalisée à l'aide de transcrit (Fau, qui code pour une protéine de type ubiquitine fusionnée à la protéine ribosomique S30 et à la protéine ribosomique L13) à l'aide d'une méthode décrite par Fonte *et al.* (2019).

***Tableau 14**. Amorces utilisées pour effectuer les analyses qPCR des différentes cibles (F : avant, R : inverse).*

Target	GenBank accession number	Sequences	Length (bp)	Anneal temper (°C)
GR1	AY549305	F : TGCACCTCGATGACCAGATG R : GGCAACTTCATACGTTCTTTGT	152	62
GR2	AY619996	F : CCTGTGTGCTGGGAGGAAC R : GTTTTGCGTGCTTCCAGGTT	114	61
Hsp90a	XM051407981	F : ATCATGGACAACTGCGACGA R : TCTTGACCAGGTTCTTGCGG	148	61
C3	HM563078	F : TGTCAAGAACTCACGGTATCTGT R : CTGGGCTGTAGTTGTGGAGG	144	59
IL-1b	AJ269472	F : GAGCTTAGTTCTGGTCCCGA R : CACTGGGTGTACGGTCCAAG	116	59
Fau	FM004681	F : GACACCCAAGGTTGACAAGCAG R : GGCATTGAAGCACTTAGGAGTTG	149	59
L13	DT044910	F : AACCCCTCTCGTGGACCTTA R : TACCGTCGAACACCTTCAGC	130	60

5.3.2.11 *Statistiques*

Comme les données sur le taux d'éclosion étaient exprimées en pourcentages proches des extrêmes bornés [0;1], l'analyse statistique a été effectuée après une transformation des données de type $y = arc\sin\sqrt{x}$. Puis les données d'éclosion ont été soumises à une analyse statistique de variance unidirectionnelle (ANOVA). Le logiciel GraphPad Prism 9.0 (Dotmatics, Boston, Massachusetts, États-Unis) a été utilisé pour effectuer des analyses statistiques sur les biomarqueurs. L'homogénéité de la variance a été déterminée à l'aide du test de Fisher, et la normalité de la distribution a été déterminée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Quand une variance et une distribution homogènes ont été observées, le test *t* du Student (paramétrique) a été utilisé. Lorsque la variance et la distribution n'étaient pas homogènes, une transformation logarithmique a été appliquée aux données pour les rendre statistiquement conformes à l'exigence du test. Pour la mesure de l'oxygène, les pentes des courbes de tendance ont été comparées à l'aide d'une méthode de régression linéaire. Le niveau minimal de signification était de $P < 0,05$, et les résultats en triplicata ont été présentés avec des valeurs moyennes ± écart-type.

5.3.3 Résultats et discussion

5.3.3.1 *Durée de l'embryogenèse et taux d'éclosion*

De la fécondation des œufs à la fin des expériences, la température d'incubation de l'eau a été maintenue à $14,5^{\pm 1,2}$ °C dans les conditions d'hypergravité (HGE) et $16,5^{\pm 1.8}$ °C en microgravité (SMGE). La différence de température est due à l'absence de thermorégulation dans la salle SMGE, et cela explique pourquoi les larves ont été observées et comptées à différents moments pour HGE (à 96 hpf) et SMGE (à 72 hpf). Le temps d'embryogenèse est directement lié à la température d'incubation. Devauchelle and Coves (1988) ont proposé un modèle robuste pour prédire la date d'éclosion des œufs de bar européen en fonction de la température d'incubation, et ce modèle a été régulièrement confirmé (Cucchi et al., 2012; Przybyla et al., 2020; Saka et al., 2001) : il a prédit le moment d'éclosion de l'expérimentation en hypergravité à l'heure près. Dans l'expérimentation en microgravité, les œufs de bar européen ont éclos 6 heures avant l'instant prévu, ce qui est conforme aux observations relatées lors de la mission spatiale pour des embryons de *killifish* (Lychakov, 2016; Scheld et al., 1976).

Les taux d'éclosion chez d'autres espèces ont déjà été évalués au cours des missions en orbite. Par exemple, avec les poissons d'aquarium (n = 50) dans le cadre de la mission *Skylab3*, le taux d'éclosion était de 96 %, et avec *killifish* (n = 50) sur la mission *Apollo-Soyouz*, il était de 22 % (Hoffman et al., 1977; von Baumgarten et al., 1975). Dans les missions qui ont suivi, les taux d'éclosion enregistrés pour le médaka étaient de 88 % (n = 48) et de 25 % (n = 4) (Ijiri, 1998; Niihori et al., 2004). Les résultats de notre expérience sur l'hypergravité à 5 g pendant 10 minutes avec des œufs de bar européen n'ont montré aucune différence significative en matière de taux d'éclosion par rapport à un témoin élevé dans des conditions industrielles optimales (figure 32).

Le groupe exposé à la microgravité simulée pendant 39 heures a enregistré la même gamme de performances d'éclosion que le groupe témoin industriel resté en laboratoire. Étant donné que nous n'avions accès qu'à une seule RPM, seuls deux taux d'éclosion ont été évalués (exposition et témoin) pour l'expérience de microgravité simulée, de sorte que ce résultat doit être considéré comme indiquant une tendance plutôt qu'une donnée robuste. Pour une raison inexpliquée, le groupe témoin en microgravité simulée dans la salle RPM avait un mauvais pourcentage d'éclosion de 46,88 %. Ce mauvais résultat ne peut pas être associé à l'héritage génétique parental, car tous les embryons étaient frères et sœurs, et la condition industrielle optimale a enregistré un taux d'éclosion de $85,29^{\pm 12,85}$ %.

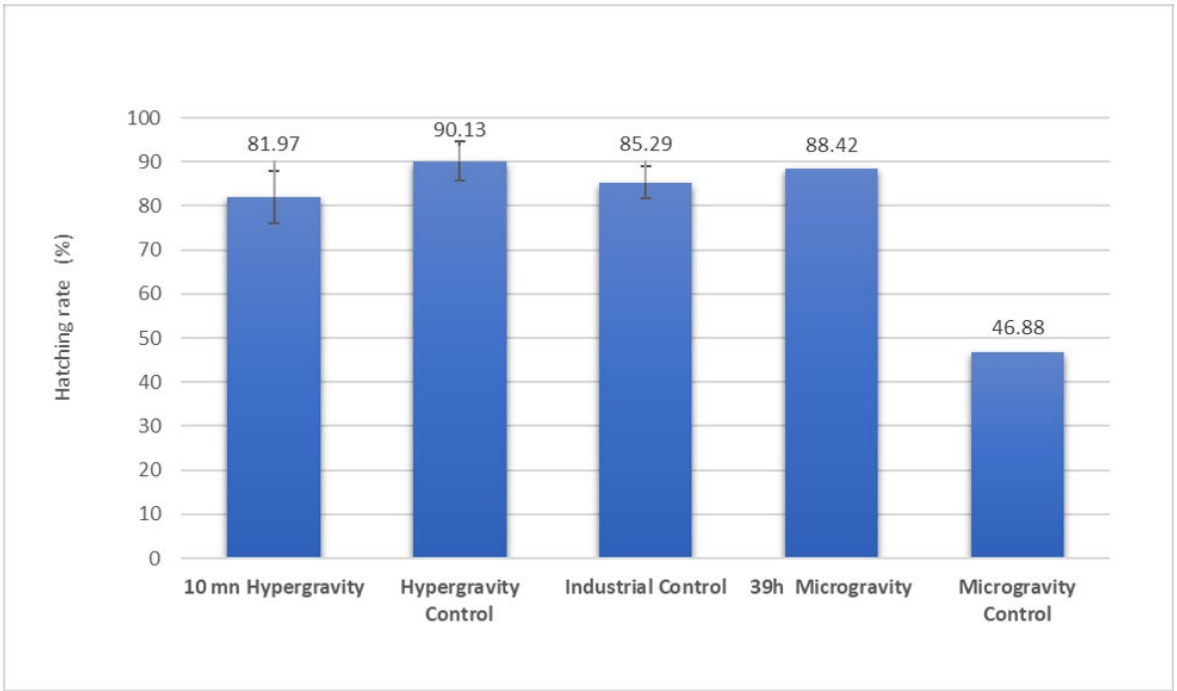


***Figure 32**. Évaluation du taux d'éclosion du bar européen (*Dicentrarchus labrax*) d'une famille de frères et sœurs dans des conditions simulées de gravité modifiée et de contrôle industriel. Dans l'expérience d'hypergravité, trois CubeSats ont été exposés pendant 10 minutes, et trois témoins n'ont pas été exposés (n = 100 embryons de poissons chacun). Dans l'expérience de microgravité, un seul CubeSat (n = 100 embryons) a été exposé à la microgravité simulée pendant 39 heures, et le groupe témoin (n = 100 embryons) n'a pas été exposé. Le témoin industriel a été élevé dans des conditions optimales. Les résultats sont exprimés en moyenne ± ET pour l'expérience d'hypergravité (n = 3).*

5.3.3.2 *Consommation d'oxygène en microgravité*

L'eau initiale utilisée pour remplir le CubeSat contenant les œufs de poissons a été suroxygénée au-delà de 200 % de la saturation, afin d'assurer un stockage d'oxygène dans l'eau suffisant pour toute l'expérience (50 heures) en confinement total dans le CubeSat. Malgré les précautions prises, la saturation initiale en oxygène était légèrement différente entre le groupe exposé (248,7 %) et le groupe témoin (240,2 %) au début de l'expérience. Néanmoins, la concentration d'oxygène à l'intérieur des deux réservoirs scellés n'a jamais été inférieure à 146 % de la saturation de l'air, et la mortalité des œufs non éclos dans l'expérience ne peut être attribuée au manque d'oxygène. La cinétique de concentration d'oxygène pendant le confinement avant l'exposition et pendant l'expérience de microgravité est présentée en figure 33.

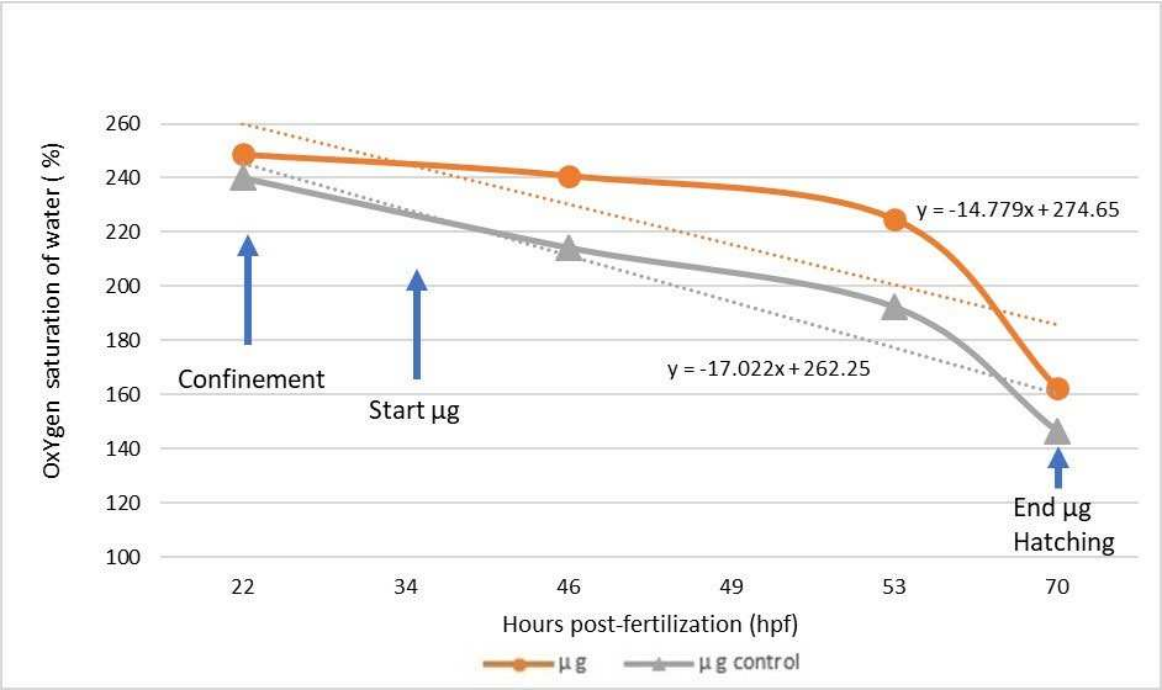


***Figure 33**. Concentration d'oxygène à l'intérieur du CubeSat pour le groupe exposé (n = 100 embryons) et le groupe témoin (n = 100 embryons), et courbes de tendance pendant l'expérience de microgravité simulée. La différence entre la pente du groupe de microgravité et du groupe témoin n'est pas significative (P = 0,8074).*

Les pentes des courbes de tendance du groupe exposé et du groupe témoin n'étaient pas significativement différentes (P = 0,8074), ce qui suggère que l'environnement de microgravité n'a pas généré de demande biologique supplémentaire en oxygène au cours du développement embryonnaire. De plus, un calcul de la consommation individuelle d'oxygène basé sur le volume d'oxygène consommé au cours de l'expérience et les poissons survivants (embryons vivants et larves écloses) dans les deux groupes a révélé que les embryons en microgravité ne consommaient pas plus d'oxygène que dans le groupe témoin. Le nombre d'œufs morts (donc non éclos) était plus élevé dans le groupe témoin (52,08 %) que dans le groupe exposé (11,58 %). Nous n'avons pas été en mesure de vérifier quand la mortalité s'est produite exactement, avant ou pendant l'exposition en microgravité. Les valeurs de consommation d'oxygène dans l'expérimentation correspondaient à celles observées dans une étude antérieure sur *Dicentrarchus labrax* (Pionetti, 1983), et ainsi que d'autres espèces marines étudiées (tableau 15). Statistiquement, la consommation individuelle d'oxygène des œufs ne différait pas entre le groupe exposé et le groupe témoin en microgravité simulée.

***Tableau 15**. Comparaison de la consommation individuelle d'oxygène (µg/œuf/h) dans l'expérience de microgravité simulée par rapport à la littérature sur d'autres espèces marines, en fonction de la température de l'eau.*

Embryo specie	*Embryogenesis temperature (°C)*	*Oxygen consumption (µg/egg/h)*	*Author*
Gadus morhua	*6*	*0.01*	*(Finn et al., 1995b)*
Clupea harengus	*8*	*0.05*	*(Kiøarboe and Møhlenberg, 1987)*
Salmo trutta	*11.5*	*0.70*	*(Régnier et al., 2010)*
Scophthalmus maximus	*15*	*0.12*	*(Finn et al., 1995a)*
Dicentrarchus labrax	*15*	*0.11*	*(Pionetti, 1983)*
Dicentrarchus labrax	***19***	***0.08***	***MICROGRAVITE (this study)***
		0.11	***CTRL MICROGRAVITE***
Danio rerio	*25*	*0.37*	*(Bang et al., 2004)*
Thunnus albacares	*27*	*0.70*	*(Pasparakis et al., 2022)*

5.3.3.3 *Indice de qualité de l'ARNm*

La qualité de l'ARN a été estimée afin d'évaluer la dégradation possible des échantillons lors des expositions altérées de gravité. L'ARN joue un rôle central dans la lecture de l'information codée dans le génome et son transfert en protéines. Nous avons eu recours au nombre d'intégrité de l'ARN (RNA Integrity Number - RIN) comme outil de diagnostic pour estimer la qualité des échantillons, car il a été utilisé avec succès comme indicateur d'une bonne transcription de l'ARN (Schroeder *et al.*, 2006). Les valeurs RIN vont de 10 (intact) à 1 (totalement dégradé). La figure 34 montre que 10 minutes passées à une hypergravité de 5 g ont légèrement mais significativement diminué le nombre d'intégrité de l'ARN (valeur p = 0,009), tandis que 39 heures de microgravité simulée ne l'ont pas affecté de manière significative.

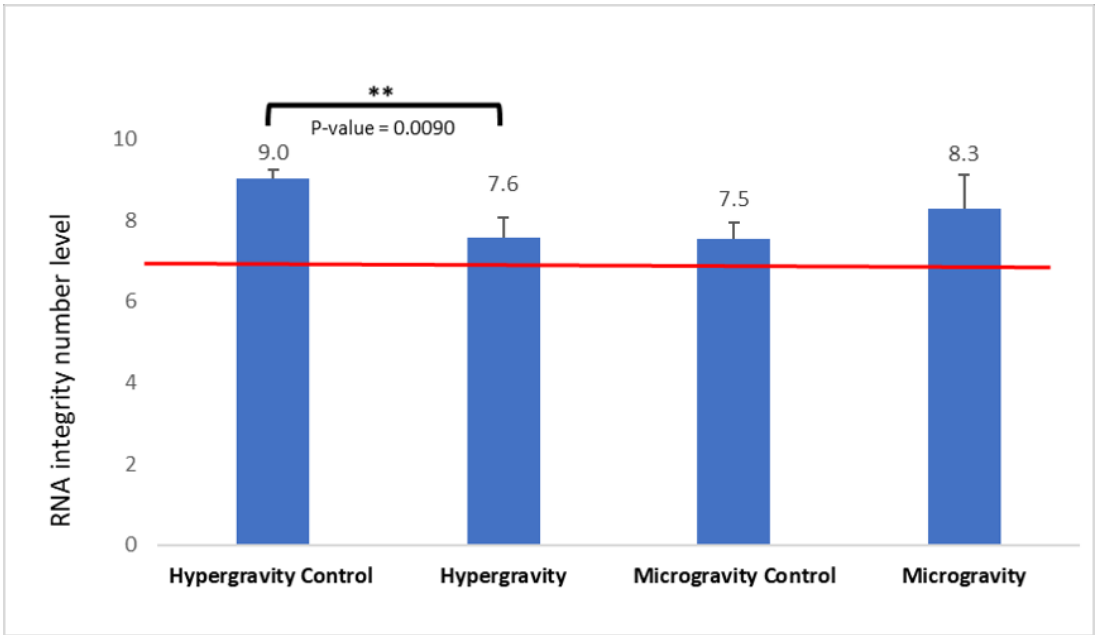


***Figure 34**. Effets de l'exposition à l'hypergravité (10 minutes à 5 g) et à la microgravité simulée (39 heures sur le RPM) sur* Dicentrarchus labrax *valeur RIN moyenne. Les résultats sont exprimés en moyenne ± ET. La différence statistiquement significative a été trouvée en utilisant le test t de Student. **p<0,05.*

Dans cette étude, toutes les valeurs de RIN obtenues étaient supérieures à 7, ce qui est considéré comme un ARNm de haute qualité chez le poisson-zèbre *Danio rerio (*Mazzolini *et al.*, 2018), la daurade rouge *Pagrus major* (Nakatsuji *et al.*, 2019) et la daurade royale *Sparus aurata* (Vallejos-Vidal *et al.*, 2022). Alors que l'expérience d'hypergravité a montré une influence significative de l'intégrité de l'ARN en faveur du lot exposé à l'hypergravité par rapport à son témoin, la valeur moyenne globale du RIN est de7,6 $^{\pm 0,4}$, et peut être considérée de bonne qualité pour l'ensemble des lots. Cette observation est corrélée avec le bon taux d'éclosion dans le groupe hypergravité (exposé à 81,97$^{\pm 5,96}$ % et au groupe témoin 90,13$^{\pm 4,36}$ %), suggérant que le changement environnemental d'une hypergravité de 1 g à 5 g en 10 minutes pour les embryons à 49 hpf n'a pas eu d'impacts délétères sur les larves écloses de bar européen. Dans l'expérience de microgravité, la valeur moyenne du RIN n'était pas significativement différente de celle du témoin, ce qui suggère que l'intégrité de l'ARNm et le mécanisme transcriptomique chez les embryons de bar européen n'ont pas été modifiés par 39 heures de microgravité simulée de 34 hpf avec le temps d'éclosion à 96 hpf. Ce constat est corrélé avec le bon taux d'éclosion dans le groupe EMSC (88,42 %). Cette évaluation de la bonne qualité de l'indice ARNm dans nos lots expérimentaux nous autorise à poursuivre les analyses de transcrits dont on pourra justifier la représentativité des résultats à travers le RIN.

5.3.3.4 *Évaluation du stress des poissons en gravité altérée simulée*

Récepteurs glucocorticoïdes et protéine chaperonne

Des études antérieures sur des juvéniles de *Sparus aurata* (150 g) ont montré que l'expression de GR1 peut être significativement différente 6 heures après le phénomène de stress (Vallejos-Vidal *et al.*, 2022). Lors de notre session expérimentale, l'échantillonnage des larves HGE a été effectué 47 heures après l'exposition à la centrifugeuse. Il n'est donc pas surprenant que les récepteurs glucocorticoïdes aient récupéré un niveau homéostatique basal comparable à celui du lot témoin (Fig. 35). Cela indique que la régulation des transcrits des récepteurs glucocorticoïdes au cours de l'embryogenèse du bar européen

n'a pas été altérée par la simulation d'hypergravité d'un lancement d'une mission spatiale à un stade précoce de développement.

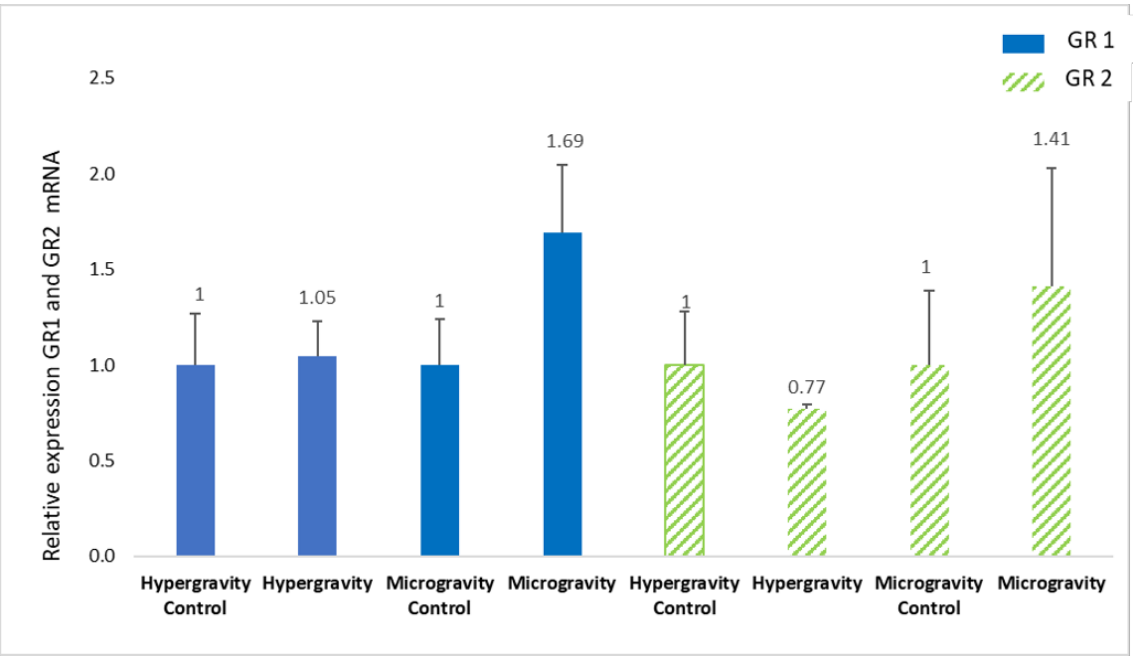


Figure 35. *Effets de l'exposition du bar européen (*Dicentrarchus labrax*) à l'hypergravité (10 minutes à 5 g) ou à la microgravité simulée (39 heures sur un RPM) sur les niveaux d'ARNm des récepteurs glucocorticoïdes 1 et 2 (GR1, GR2). Les valeurs relatives obtenues avec des embryons témoins ont été fixées à 1. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type.*

L'expression relative de GR1 et GR2 chez les larves de *Dicentrarchus labrax* après 39 heures d'exposition à la microgravité simulée (échantillonnée environ 4 heures après l'éclosion) n'a révélé aucune différence significative sur le récepteur impliqué dans la régulation du cortisol. L'éclosion a eu lieu à 96 hpf, et les embryons de poissons (n = 100) ont passé 39 heures à l'intérieur d'un CubeSat scellé dans le RPM, ce qui représente 41 % du développement total de l'embryon. Nous n'avons pas observé de différences significatives entre l'expression de GR1 et GR2 au stade post-éclosion, contrairement aux études sur l'ontogenèse du bar européen sans stress (Pavlidis *et al.*, 2011), ou à celle avec un stress pathogène où une réponse de sensibilité plus élevée de GR2 que de GR1 a été observée au stade juvénile (Reyes-López *et al.*, 2018). Nos résultats ont montré le même niveau d'expression des récepteurs du cortisol dans les conditions d'exposition et de contrôle, suggérant que la gravité altérée simulée n'a pas influencé le niveau de stress pendant l'embryogenèse du bar européen.

L'activité de la protéine chaperonne Hsp90α est directement liée à la fonction de GR1 et GR2. Aucune différence statistique significative dans l'expression de l'ARNm Hsp90α n'a été observée dans les deux expériences (figure 36).

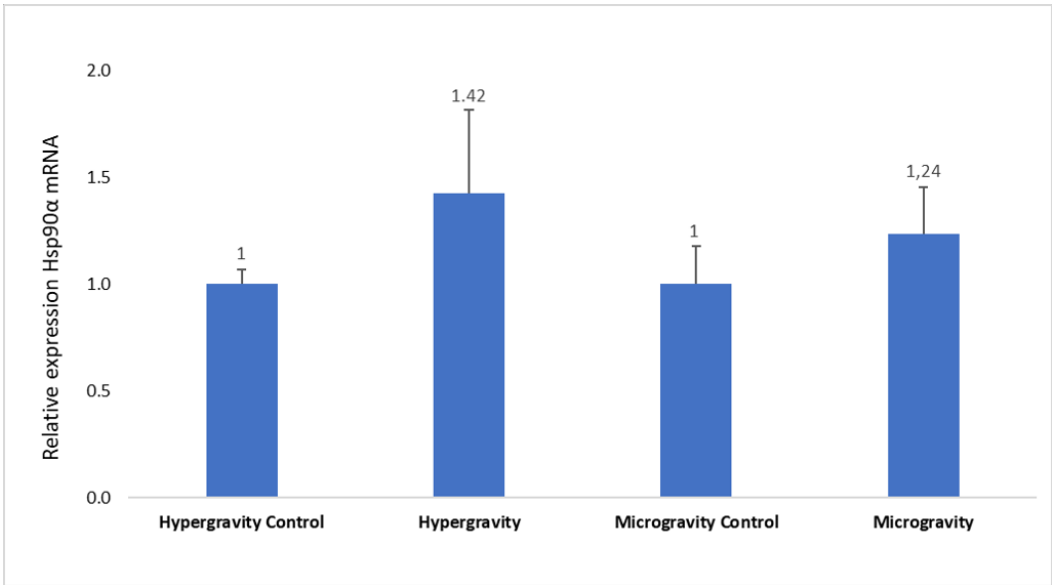


Figure 36. *Effets de l'exposition à l'hypergravité (10 minutes à 5 g) ou à la microgravité simulée (39 heures sur un RPM) sur les niveaux d'ARNm du* Dicentrarchus labrax *Hsp90α. Les valeurs relatives obtenues avec des embryons témoins ont été fixées à 1. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type.*

L'équipe de Madeira *et al.* (2016) a exposé des larves de daurades *Sparus aurata* âgées de 35 jours à un stress de type abiotique basé sur la variation de la température de l'eau. Elle a détecté une augmentation de l'expression de Hsp90α suite à ce mode de stress. Chez le bar européen, une régulation négative du GR1 et du GR2 a été observée dans l'hypothalamus de poissons soumis à une densité d'élevage relativement faible (Geffroy *et al.*, 2021). Dans notre étude, nous n'avons pas observé de variation significative de GR1, GR2 et Hsp90α par rapport aux groupes témoins. Les niveaux de transcription entre les récepteurs glucocorticoïdes et leur protéine chaperonne sont proportionnels, ce qui indique que nos mesures sont cohérentes, et nous permet de conclure que nos deux conditions expérimentales de gravité altérée n'affectent pas cette voie physiologique de stress chez les embryons de bar européen.

5.3.3.5 *Système immunitaire inné : protéines C3 et IL-1β*

Chez les vertébrés, l'immunité innée est un système de défense non spécifique. Ce mécanisme est impliqué dans l'identification et la lutte contre les agressions extérieures. Notre étude a analysé deux transcriptions de gènes investis dans ce système immunitaire dans des conditions de microgravité et d'hypergravité extrêmes. Les résultats ont montré une expression relative variable de la protéine C3, qui était très différente de celle du témoin 1 g (figure 37). Des études sur la protéine C3 chez les juvéniles de daurade royale et de bar européen (pesant environ 30 g) suggèrent qu'un plan d'échantillonnage d'effectif $6<n<10$ est pertinent pour obtenir une bonne sensibilité à l'analyse C3 (Mauri et al., 2011; Vaz et al., 2022). Dans notre étude, les échantillons de tissus larvaires étaient plus petits que dans l'étude précitée, mais le nombre de larves prélevées par bassin était de $5<n<15$ pour l'expérience de microgravité et $n = 20$ pour l'expérience d'hypergravité. Nous supposons donc que le seuil de détection était suffisant pour valider nos mesures.

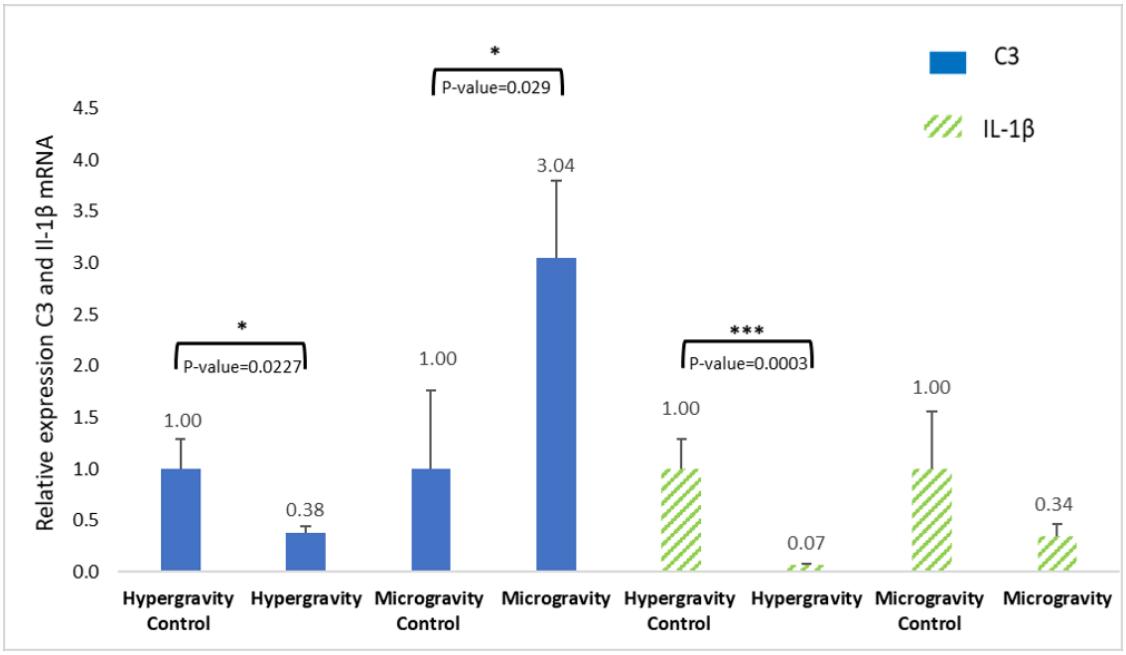


***Figure 37**. Effets de l'exposition à l'hypergravité (10 minutes à 5 g) ou à la microgravité (39 heures sur un RPM) sur les niveaux d'ARNm C3 et IL-1β chez* Dicentrarchus labrax. *Les valeurs relatives obtenues avec des embryons témoins ont été fixées à 1. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± ET. Des différences statistiquement significatives ont été trouvées à l'aide des tests t de Student. * p<0,05, *** p<0,001.*

Dans des conditions expérimentales, Lange *et al.* (2004) ont détecté la présence de C3 dans les larves de morue (*Gadus morhua* L.), dans la membrane du sac vitellin et dans les muscles 1 jour après l'éclosion. La plie olive (*Paralichthys olivaceus*) exprime la protéine C3 à l'éclosion par rapport à la veille (stade embryonnaire) et au lendemain de l'éclosion (Lee *et al.*, 2013). L'expression de C3 a également été étudiée sur la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et sur le saumon atlantique (*Salmo salar*) du stade embryonnaire au stade larvaire. Les expressions isoformes de la protéine C3 augmentent significativement juste après l'éclosion (Løvoll et al., 2006; Løvoll et al., 2007). Ces observations sont conformes au résultat du groupe exposé à la microgravité, mais pas à celui du groupe exposé à l'hypergravité.

La littérature sur l'expression de la protéine C3 chez les larves de bar européen est pauvre, de sorte que nous ne pouvons pas tirer une conclusion fiable sur l'inhibition significative de C3 observée dans le groupe exposé à l'hypergravité. Cependant, cette différence d'expression relative au C3 n'a eu aucune conséquence sur le taux d'éclosion enregistré dans le groupe HGE ($81,97^{\pm 5,96}$ %) et le groupe SMGE (88,42 %). L'étude a révélé que la protéine C3 du complément est exprimée dans des pré-larves de *Dicentrarchus labrax* 4 heures après avoir quitté le chorion, ce qui suggère qu'une partie du système inné est fonctionnelle dans les deux contextes gravitationnels.

L'interleukine-1β est produite par des macrophages actifs. Elle est impliquée dans l'infection et l'inflammation, mais elle peut également jouer un rôle dans la réponse au stress aigu, comme cela a été montré chez la carpe commune *Cyprinus carpio* (Metz *et al.*, 2006). Son expression a été observée chez le bar européen 12 heures après une infection par une *Vibrio anguillarum* à 5 jours après l'éclosion (Reyes-López e*t al.*, 2018). La surexpression de l'IL-1β chez les juvéniles de bar européen peut apparaître de 1,5 heure à 8 heures après une infection à une *Vibrio anguillarum* (Meloni *et al.*, 2015). La figure 37 montre que 10 minutes passées à une hypergravité de 5 g ont significativement diminué le niveau d'expression de l'ARNm IL-1β. L'IL-1β a aussi été détectée 4 heures après l'éclosion, indiquant

l'activation du système immunitaire inflammatoire inné dans les deux gravités. Le faible niveau d'expression d'IL-1β confirme que l'altération de la gravité n'induit pas d'inflammation ou de stress. Le système immunitaire inné a été étudié chez plusieurs espèces de poissons, mais notre analyse est la première de la littérature à enregistrer l'expression des protéines de C3 et IL-1β chez le bar européen une centaine d'heures après l'éclosion. Le bon taux d'éclosion et la vitalité des jeunes larves indiquent que physiologiquement, l'inhibition significative du complément C3 et de l'IL-1β dans les groupes d'hypergravité n'impacte pas un développement normal. La sous-expression de C3 et d'IL-1β confirme l'absence de dommages inflammatoires ou physiologiques après une exposition altérée de la gravité. Toutefois, cette faible réponse de transcrit pourrait révéler une mise en place différée de l'activation du mécanisme de défense pro-inflammatoire. Il serait utile d'étudier l'expression de ces protéines plusieurs jours après l'éclosion pour vérifier le bon développement du système immunitaire dans ces conditions de gravité altérée.

5.3.4 Conclusion

Cette étude prospective indique que le mécanisme de l'embryogenèse chez un poisson d'aquaculture peut suivre un développement normal dans des conditions simulées d'hypergravité et de microgravité. Une étude plus approfondie du système immunitaire inné de *Dicentrarchus labrax* à 1 g et à des conditions d'hypergravité et de microgravité au stade larvaire pourrait confirmer nos observations et intuitions selon lesquelles ce système est intact après une exposition altérée à la gravité durant la moitié de l'embryogénèse. Nous avons effectué nos expériences de gravité altérée séparément pour permettre des résultats, des analyses et des conclusions dans des situations d'étude mono-paramétrique pour chaque contexte de gravité. Une autre étude au sol pourrait impliquer un plus grand nombre d'embryons pour simuler la microgravité en triplicata afin de consolider notre hypothèse sur l'absence d'effets sur le stress des poissons et le système immunitaire inné. L'exposition successive à une hypergravité de 10 minutes (durée de lancement) et à la microgravité (aussi longtemps que possible) devrait également être testée dans une expérience future afin de comprendre l'effet cumulatif de ces deux conditions sur les embryons de poissons d'aquaculture.

Dans l'histoire de l'exploration spatiale, le plus court trajet pour atteindre la Lune était lors de la mission *Apollo 8* avec 69 heures de vol, mais la durée moyenne de ce voyage est d'environ 72 heures. Cela signifie que notre expérience de microgravité de 39 heures ne correspond qu'à la moitié (54 %) d'un voyage standard sur la Lune. Suite à une étude précédente sur la résistance des œufs fécondés de bar européen et de maigre aux vibrations d'un lanceur spatial (Przybyla *et al.*, 2020), cette étude renforce le concept de la faisabilité d'expédier des œufs de poissons vers la Lune pour rejoindre une AMTI dans une serre agricole ou en boucle secondaire d'un système de traitement de l'eau (Pickett *et al.*, 2020). Les organismes aquatiques élevés/cultivés pourraient fournir aux astronautes des acides aminés pour compléter les sources végétales, et offrir une alimentation plus équilibrée, mais surtout des AGPI aquatiques.

Au-delà de l'apport nutritionnel, la variété, la texture et la saveur des espèces aquacoles pourraient aider à éviter la « fatigue des menus » dans l'espace, due à la consommation répétée des mêmes aliments et à la perte de masse corporelle qui en résulte (Douglas *et al.*, 2020). Les résultats de cette étude permettent d'envisager une véritable preuve de concept pour valider les résultats lors d'une mission spatiale en orbite terrestre basse ou lors d'une mission scientifique lunaire.

6 PERSPECTIVES

Les AMTI en milieu naturel ou contrôlé restent une discipline récente (Chopin *et al.*, 2000). Les initiatives de recherche sont relativement éparpillées sur la scène nationale, européenne et mondiale. Les équipes de recherche ressentent l'intérêt de se fédérer à travers un réseau qui reste à construire pour atteindre l'objectif du « zéro rejet ».

L'émergence des connaissances relatives à la gestion d'une cascade trophique en milieu clos et contrôlé autorise la conceptualisation de tels systèmes en environnement extrême.

Une base lunaire est l'environnement le plus extrême imaginable, car à la différence d'une ville ou d'un désert, le lieu d'implantation n'est en contact avec aucun gaz atmosphérique. Sur Terre, l'air à la surface de l'eau, ainsi que la diversité bactérienne ou cellulaire peuvent jouer un rôle dans l'équilibre du système. Dans un milieu d'élevage entièrement clos, ce seront bien la technologie, la connaissance des organismes élevés/cultivés, leurs seuils de tolérance et leurs interactions directes qui seront les vecteurs de réussite pour la mise en place d'aquacultures en milieu fortement contraint, contrôlé et extrême.

Il est aisé de constater la présence d'un « effet miroir » entre les challenges de recyclage des futures aquacultures durables sur la Terre et le défi de l'aquaculture spatiale. Nul doute que les avancées réciproques enrichiront mutuellement les deux sujets de recherche. Le sujet de l'aquaculture spatiale, bien qu'émergent sur la scène mondiale, reste confronté à une feuille de route dont la méthodologie expérimentale passera, comme pour les AMTI terrestres, par une étude mono-paramétrique de l'impact des changements d'environnement sur les organismes biologiques.

La complexité de simuler sur Terre l'ensemble cumulé des paramètres de l'environnement spatial nécessitera de programmer des expérimentations *in situ* en orbite basse ou lors d'une mission lunaire pour valider les données et concepts étudiés en simulation terrestre.



6.1 Fédérer une stratégie de recherche en AMTI à l'échelle nationale ou européenne

En comparaison avec d'autres sujets de recherche tels que la nutrition ou la physiologie du poisson, l'aquaculture multitrophique intégrée est un nouveau segment de la recherche aquacole. Cette discipline est de plus en plus étudiée dans les laboratoires du monde entier. À l'échelle nationale, alors que les attentes sociétales sur le recyclage et la circularité des productions animales sont à la fois concrètes et pressantes, les initiatives de recherches en AMTI sont souvent locales sur des thèmes ciblés en fonction des organismes étudiés. De plus, le faible nombre d'expérimentateurs investis dans cette recherche est éparpillé au sein de différentes structures de recherche sur le territoire français (INRAE, Ifremer, CIRAD, IRD, universités).

Une approche européenne exploratoire basée sur une revue de la littérature et des entretiens avec des experts conclut que les parties prenantes de ce sujet de recherche ont des points de vue souvent différents sur les futures voies de développement et de connaissances à déployer pour appréhender la gestion de ces systèmes complexes. De plus, les conditions et les structurations institutionnelles ne sont pas adaptées pour obtenir des résultats coordonnés (König *et al.*, 2018). Sans dichotomie entre le milieu marin et continental, la mise en place d'un réseau de recherche sur les AMTI, d'échanges, d'animation, et surtout une comparaison de pilotes expérimentaux, apporteraient une lisibilité sur les acquis en matière d'interactions entre les espèces en milieu contrôlé, et sur le chemin à parcourir pour atteindre divers schémas de boucles résilientes, productives et extrêmes.

Cette fédération de connaissances en réseau à petite ou moyenne échelle sur les AMTI est certainement un challenge relationnel qui fournirait un socle robuste pour définir des systèmes de productions aquatiques innovants et disruptifs, tels que l'aquaculture urbaine, ou encore le design d'une production de poissons en milieu fortement contraint clos et contrôlé sur une base lunaire.

6.2 L'aquaculture urbaine : une production semi-extensive en milieu contrôlé

Depuis la fin des années 2010, le progrès dans les connaissances techniques et scientifiques a amené l'idée de l'agriculture urbaine, qui pourrait conduire à une deuxième révolution verte, et correspondre à une demande alimentaire en circuit court et entièrement recyclé (Armanda *et al.*, 2019).

L'aquaponie et l'AMTI sont des concepts de productions aquacoles durables en circuit recirculé avec, toutefois, une structuration différente. L'aquaponie est une approche de couplage de deux technologies : l'aquaculture en recirculation (pisciculture) et la culture hydroponique (culture hors sol). C'est un système où le cycle de l'eau n'est pas fermé sur lui-même. L'AMTI, elle, est un système de circulation d'eau bouclé sur lui-même, exclusivement aquacole, avec des compartiments en recirculation pour lesquels les organismes photosynthétiques terrestres de l'aquaponie sont remplacés par les algues. Bien qu'ils soient perçus comme des moyens de contribuer à un système alimentaire, l'aquaponie et l'AMTI en milieu clos et urbain ne sont pas entièrement à relier à un défi de sécurité alimentaire, mais bien à une philosophie de recyclage et de circuit court de consommation. Ces systèmes technologiques en sont encore à leurs balbutiements. Par exemple, l'aquaponie est une préoccupation majeure pour la ville de Singapour en raison de l'urbanisation rapide de cette dernière, de la rareté des surfaces disponibles et de la faiblesse de la production alimentaire locale de poissons ou de légumes. En tant que tel, le système d'aquaponie

est en capacité de proposer une agriculture urbaine semi-autonome et respectueuse de l'environnement pouvant attirer les pisciculteurs expérimentés ou des amateurs, comme il est possible d'en rencontrer dans les potagers partagés urbains aujourd'hui (Kyaw and Ng, 2017). Les villes productives sont l'un des moyens les plus importants de parvenir à une consommation en circuit court de produits aquatiques. Dans une économie de marché ou planifiée, la production alimentaire est la fonction la plus fondamentale et doit être définie comme une priorité. Compte tenu des caractéristiques des bâtiments et des limites de l'environnement urbain, l'aquaponie est une technologie verte sûre et saine qui protège l'environnement écologique et qui a un fort potentiel pour combiner les bâtiments urbains et la technologie de culture des plantes.

Du côté de l'AMTI urbaine, un premier essai en taille réelle a été réalisé sur un site de recherche de Shanghai en Chine, impliquant une boucle du système de production avec une biomasse de 10 kg de loches (*Misgurnus anguillicaudatus*) et une microalgue d'eau douce (*Spirogyra sp*.). Les résultats ont montré que la teneur en oxygène dissous dans le système augmentait considérablement, et que la baisse de pH causée par les bactéries nitrifiantes pouvait être équilibrée par la culture de *Spirogyra sp.* jouant un rôle dans la réduction de la teneur en nitrite. Les données expérimentales ont aussi montré que le système AMTI avec des algues avait une capacité d'autorégulation forte, et que la mise en compartiments proposait une flexibilité du système en cas de stimulation d'un des modules, comme une exposition lumineuse plus intense des algues (Zhang *et al.*, 2022). La culture algale est un compartiment vital aux multiples services écosystémiques pour la boucle, qui offre de multiples scénarios (figure 38) potentiels de cultures ou d'innovations (Yang *et al.*, 2019a).

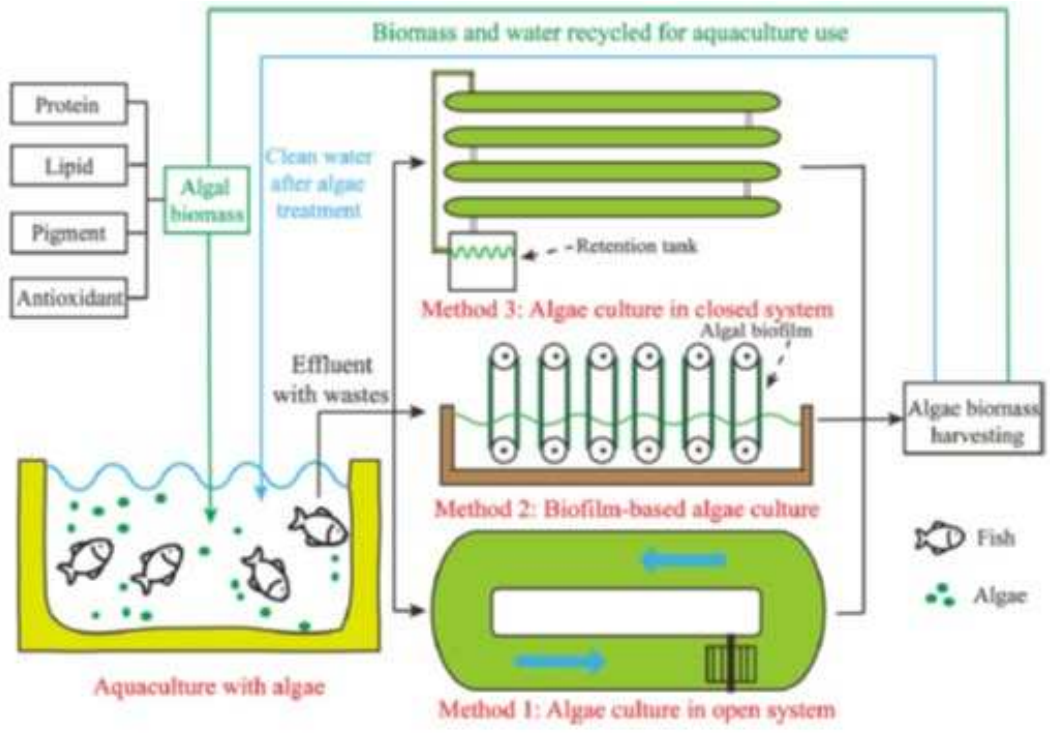


Figure 38. *Diverses méthodes de cultures d'algues en AMTI milieu clos et contrôlé, (1) photobioréacteur, (2) récolte en biofilm, (3) système ouvert en bassins, d'après Yang* et al. *(2019a).*

Dans un système d'AMTI urbain européen, il est possible d'obtenir un intrant abondant de déchets culinaires (préparation et gaspillage post-prandiale) pour le fonctionnement de la boucle de production (comme fertilisant) et de contribuer à réduire l'empreinte carbone des systèmes. Ainsi, les villes de Glasgow (Écosse) et de Lyon (France) ont évalué une baisse de l'empreinte carbone de 7,8 % et 12,6 % respectivement (Weidner and Yang, 2020). Ces déchets de haute qualité peuvent aussi constituer un intrant alimentaire de choix pour une biomasse de poisson d'aquaculture en circuit clos et contrôlé (Ayer et al., 2007; Perez-Pascual et al., 2020; Tacon et al., 2020; Thompson et al., 2008; von Holst et al., 2006).

6.3 Feuille de route de la recherche en aquaculture spatiale

La feuille de route de la recherche en aquaculture spatiale à travers la proposition du programme LUNAR HATCH est constituée de deux parties distinctes :

- la faisabilité de faire voyager un embryon d'organisme aquacole (ici, un poisson) de la Terre à la Lune, avec les contraintes d'une mission spatiale ;
- la faisabilité de définir le système AMTI sur la base lunaire en capacité d'accueillir une biomasse élevée, avec des contraintes logistiques et environnementales.

6.3.1 Compléter l'étude des paramètres environnementaux

À ce jour, les études sur les vibrations d'un lanceur spatial (voir chapitre 5.2) ainsi que sur l'hypergravité et la microgravité (voir chapitre 5.3) appliquées aux embryons de bar et de maigre ont montré la résistance de l'organisme à ces trois contraintes spatiales.

Lors d'un vol vers la Lune, l'exposition aux rayonnements cosmiques secondaires fait partie des phénomènes susceptibles d'influencer le développement embryonnaire du poisson. Des tests de nage sur des larves de médaka (poissons d'ornement) ont été effectués en microgravité pendant des missions spatiales (Anken et al., 2002; Ijiri et al., 2003; Rahmann and Anken, 2002). Les œufs de poissons d'eau douce (*Danio rerio*, poissons d'ornement) ont été exposés à de faibles débits de rayonnements gamma externes (de 1 à 1 000 mGy j^{-1}) sur une période de 20 jours (Simon *et al.*, 2011). L'irradiation gamma peut induire des dommages sur la neurotransmission larvaire, ce qui pourrait avoir des répercussions sur la locomotion (Gagnaire *et al*., 2015). Toutefois, des expositions au spectre de rayonnements ionisants caractéristiques de l'environnement radiatif spatial dans les conditions des voyages lunaires n'ont à ma connaissance jamais été réalisées sur des poissons. L'environnement radiatif spatial comporte deux sources de rayonnements ionisants pouvant présenter des risques biologiques en raison de leurs hautes énergies : les rayonnements cosmiques galactiques (~90 % protons, 12 % de particules alpha et 1-2 % d'ions lourds), et les événements à particules solaires, qui sont des expositions de courte durée à des protons très énergétiques (de 10 MeV à plusieurs GeV) (Chancellor *et al.*, 2018). À l'intérieur de la station lunaire ou du véhicule spatial qui va convoyer les poissons, les particules secondaires produites par l'interaction de ces rayonnements cosmiques primaires et des atomes constituant la structure de la station génèrent un spectre complexe constitué en majeure partie de neutrons et de rayonnements gamma. Toutefois, des outils de simulations existent et peuvent contribuer à conduire des expérimentations au sol.

Il est intéressant de noter les limites de l'expérimentation de simulation sur Terre. À ce jour, les plateformes expérimentales de physique nucléaire dans le monde ne peuvent expérimenter qu'une seule

particule à la fois (figure 39). Ici, dans le cadre de LUNAR HATCH, l'exposition de simulation sera, soit pour une exposition aux neutrons secondaires, soit pour une exposition aux protons secondaires, mais jamais pour l'ensemble du bouquet de particules (rayonnements : α, β, γ, proton, électron, neutron, ion métallique). Ces expérimentations sont envisagées en collaboration avec l'Institut de recherche et de sécurité nucléaire (IRSN) en utilisant les accélérateurs de particules AMANDE (neutrons) et MIRCOM (protons).

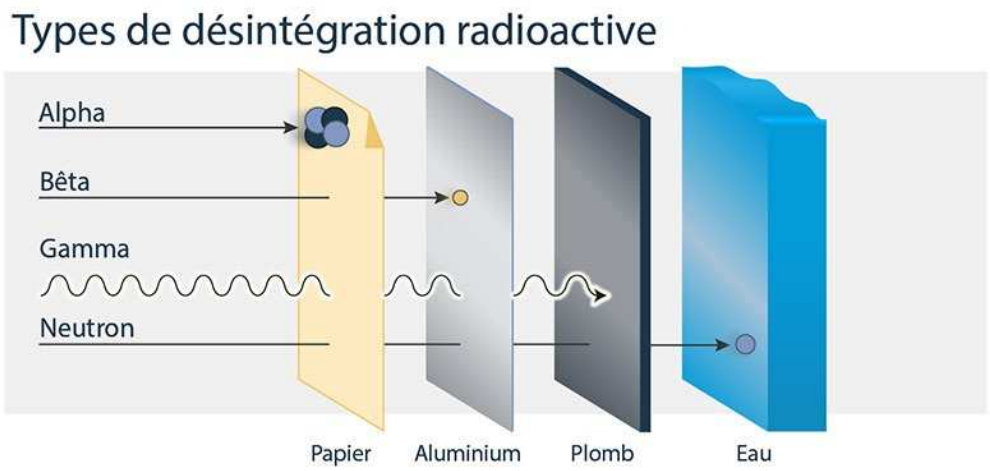


Figure 39. *Rayonnements secondaires dans l'habitacle d'un véhicule spatial et leurs contre-mesures. Pouvoir de pénétration du neutron dans un aquarium. ©Canadian nuclear safety commission*

Ainsi, la seule expérimentation pouvant satisfaire une exposition à toutes les particules secondaires en même temps est une exposition en conditions réelles, c'est-à-dire une mission en orbite basse dans la Station spatiale internationale, par exemple.

L'analyse de l'ensemble des résultats présentés précédemment, lors d'expérimentations en mono-paramétrique, apporte des conclusions sur le taux de survie et d'éclosion, mais aussi sur le stress de l'embryon associé à la consommation d'oxygène de ce dernier.

L'impact de la somme des particules chargées, qui peut déposer de fortes énergies à de faibles expositions ou de faibles énergies de façon permanente, aurait la capacité d'altérer l'intégrité de l'un des brins d'ADN, voire les deux à la fois. Ces dommages dans le cas d'un monobrin pourraient être réversibles, impliquant de multiples mécanismes de réparation. Toutefois, une altération des deux brins pourrait impacter plus profondément la qualité de la réplication en provoquant des mutations (d'adaptation ou délétères) ou, plus radicalement, en mettant en péril la viabilité de l'organisme à court terme.

6.3.2 L'étude des effets environnementaux combinés

Toutefois, la combinaison par simulation de tous ces facteurs appliqués dans le même espace temporel permettra de vérifier si un effet cumulatif des paramètres pourrait impacter l'intégrité des embryons ou la survie des larves écloses, à leur arrivée dans l'AMTI lunaire. Il est nécessaire d'expérimenter une mise en microgravité simulée à la suite d'un test qualificatif de vibration d'embryons de poissons. L'ensemble de la chaîne d'événements (vibrations, hypergravité, microgravité, exposition cosmique secondaire) reste

toutefois difficile à construire expérimentalement, et une fois de plus, la limite des moyens expérimentaux engendre le recours à des expérimentations en orbite basse terrestre ou en mission lunaire.

6.3.3 Missions spatiales de preuve de concept

La validation d'une mission en orbite basse terrestre embarquant des œufs fécondés de poissons d'aquaculture est à ce jour à l'étude. Je souhaite travailler avec des experts en transcriptomique et sur l'intégrité de l'ADN (voir paragraphe précédent) lors des situations de simulation de mission avec des œufs fécondés de poissons. Ces aspects devront pouvoir être développés lors des missions en situation réelle.

Au-delà de l'étude des paramètres biologiques déjà analysés en simulation terrestre (taux d'éclosion, stress, consommation d'oxygène, immunité) qu'il faudra probablement renouveler en milieu spatial, l'étude par une approche RNAseq du génome entier (couvrant tous les transcrits) permettrait d'appréhender l'incidence du milieu spatial sur un poisson. Le système d'analyse des échantillons devra être embarqué et réalisé sur place, ou envisagé suite à un retour d'échantillons lors de missions habitées ou robotiques.

Le programme LUNAR HATCH a été présélectionné par l'Agence spatiale européenne (ESA) pour être embarqué lors d'une mission « BioMoon », qui est une mission biologique à bord de l'atterrisseur lunaire européen *Argonaut* (figure 40). Cette mission de 1,8 tonne de charge utile propose un vol et un alunissage, pour des expérimentations indépendantes les unes des autres, impliquant des organismes vivants allant de la bactérie, des plantes, des microalgues et des vers terrestres, jusqu'aux vertébrés, qui seront représentés par les embryons et les larves du programme LUNAR HATCH. Cette mission lunaire permettrait de se rapprocher des conditions de convoyage des embryons de poissons lors d'un ravitaillement par cargo. Sa programmation est dépendante du calendrier de la mise en service du porteur lourd européen *Ariane 6*, et est prévue pour 2034.



Figure 40. *L'atterrisseur européen* Argonaut *et l'emblème de la mission biologique sur la Lune « BioMoon ». ©ESA.*

6.3.4 Collaborations académiques et partenariats industriels

À l'image du réseau AMTI national ou mondial à créer, l'aquaculture spatiale est un domaine de recherche émergent, qui compte très peu d'acteurs de recherche à ce jour. Au regard de la diversité des espèces aquacoles potentiellement candidates pour les programmes d'aquaculture spatiale et de l'offre d'expertise grandissante sur les système RAS ou AMTI, la collaboration scientifique est un levier puissant pour confronter et partager les connaissances et les visions possibles. Ainsi, au-delà de la sollicitation des agences spatiales apportant un support financier au sujet (CNES, ESA, NASA), le programme LUNAR HATCH est attentif aux initiatives industrielles et à celles des start-ups du *newspace* telles que The Exploration Company (véhicule expérimental vers la Lune) ou Interstellar.lab (agriculture autonome sur la Lune). Le challenge du programme LUNAR HATCH des années à venir sera de fédérer l'écosystème académique et industriel français, européen et mondial autour du sujet de l'aquaculture spatiale, et de pratiquer un transfert des connaissances scientifiques vers l'industrie. La feuille de route du programme LUNAR HATCH est décrite en figure 41.

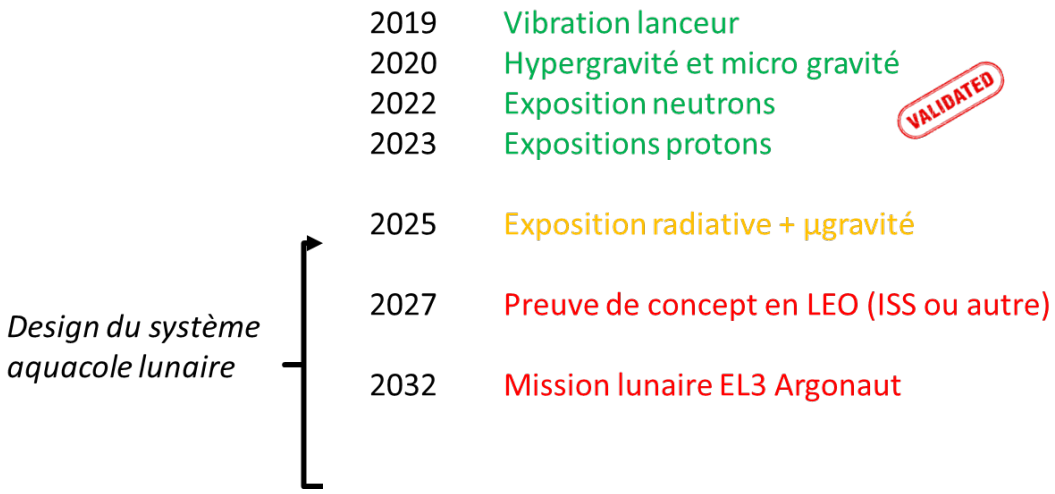


Figure 41. *Feuille de route du programme LUNAR HATCH. En vert, les projets déjà réalisés en simulation terrestre. En jaune, les projets en cours de développement en simulation terrestre. En rouge, les projets de preuve de concept planifiés lors de missions spatiales.*

7 CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de cette thèse en VAE était de mettre en avant mes recherches publiées durant ces treize dernières années sur le recyclage des effluents aquacoles, l'étude des sources de matières premières alternatives pour l'alimentation formulée pour poissons, ainsi que les premières expérimentations sur l'aquaculture spatiale. L'ambition de ce document était de montrer le cheminement méthodologique expérimental ayant conduit à proposer une vision différente et innovante d'une aquaculture extraterrestre basée sur des concepts d'actualité tels que le recyclage biologique des ressources primaires et une circularité de la production aquacole. Le cadre de cette thèse en VAE se situe bien évidemment dans un univers technologique reflétant peu la pratique ancestrale de l'aquaculture extensive qui, aujourd'hui, participe largement à la sécurité alimentaire des pays à faibles revenus.

Toutefois, l'idée de la cascade trophique contrôlée s'inspire de l'aquaculture extensive. Ses préceptes biologiques (les rejets dissous et particulaires produisent l'aliment consommé) sont repris dans le concept d'AMTI. Ce qui changera, ce sera l'intensification (la charge) du maillon de poissons qui entraînera des productivités biologiques exacerbées de la production primaire algale et des autres compartiments du système en boucle fermée. Bien que basée sur des systèmes technologiques, l'aquaculture spatiale est déconnectée d'une réalité de rendement économique, comme pourrait l'être une production terrestre en RAS. C'est un concept de service dans un esprit de support biologique à la survie en environnement extrême. Elle partage le même objectif que les AMTI, c'est-à-dire recycler biologiquement l'ensemble des molécules de rejets du système, mais avec des finalités différentes. Sur Terre, c'est l'argument de préservation de l'environnement qui prédomine. Sur la Lune, c'est l'importance vitale que représente une molécule importée, dans un environnement extrême dénué de toute ressource biologique.

En conclusion, le panorama de l'aquaculture actuelle et future est diversifié, allant de la production de masse à l'unité confidentielle, utilisant la souplesse naturelle de l'environnement, ou tentant de l'imiter avec des systèmes technologiques. La biodiversité terrestre doit être protégée comme un bien commun et comme une solution durable biologiquement et économiquement. La recherche aquacole a pour mission, aujourd'hui, de proposer à travers les AMTI des solutions argumentées écologiquement pour chaque situation d'aquaculture, aussi bien en milieu ouvert qu'en production confidentielle urbaine. Les solutions proposées par le tissu académique et industriel devront répondre à une attente sociétale forte et participer à la préservation de la biodiversité terrestre, tout en maintenant l'effort de l'aquaculture pour la sécurité alimentaire mondiale. Le succès de nos futurs systèmes de production aquatique vertueux est intimement lié aux volontés politiques de changer nos modes de production.

Cette recherche est un challenge et une vision optimiste de l'avenir, qui donnent du sens au métier de chercheur en aquaculture durable à l'échelle de l'individu, et qui le rendent passionnant au quotidien.

8 BIBLIOGRAPHIE

Abdelghany, M.F., El-Sawy, H.B., Abd El-Hameed, S.A.A., Khames, M.K., Abdel-Latif, H.M.R., Naiel, M.A.E., 2020. Effects of dietary Nannochloropsis oculata on growth performance, serum biochemical parameters, immune responses, and resistance against Aeromonas veronii challenge in Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Fish Shellfish Immunol. 107, 277-288.

Aceto, J., Nourizadeh-Lillabadi, R., Maree, R., Dardenne, N., Jeanray, N., Wehenkel, L., Alestrom, P., van Loon, J., Muller, M., 2015. Zebrafish Bone and General Physiology Are Differently Affected by Hormones or Changes in Gravity. Plos One. 10.

Altimiras, J., Claireaux, G., Sandblom, E., Farrell, A.P., McKenzie, D.J., Axelsson, M., 2008. Gastrointestinal blood flow and postprandial metabolism in swimming sea bass Dicentrarchus labrax. Physiological and Biochemical Zoology. 81, 663-672.

Anitha, S., Shah, A.R., Ali, B.M.J., 2018. Modulation of lipid productivity under nitrogen, salinity and temperature stress in microalgae Dunaliella sp. Journal of Environmental Biology. 39, 625-632.

Anken, R., Hilbig, R., 2009. Swimming behaviour of the upside-down swimming catfish (Synodontis nigriventris) at high-quality microgravity - A drop-tower experiment. Advances in Space Research. 44, 217-220.

Anken, R., Brungs, S., Grimm, D., Knie, M., Hilbig, R., 2016. Fish Inner Ear Otolith Growth Under Real Microgravity (Spaceflight) and Clinorotation. Microgravity Science and Technology. 28, 351-356.

Anken, R.H., Ibsch, M., Rahmann, H., 1998. Neurobiology of fish under altered gravity conditions. Brain Research Reviews. 28, 9-18.

Anken, R.H., Ibsch, M., Rahmann, H., 2002. Microgravity (STS-90 Neurolab-Mission) influences synapse formation in a vestibular nucleus of fish brain. in: Ijiri, K., Slenzka, K., Kronenberg, A. (Eds.), Space Life Sciences: Biological Research and Space Radiation, pp. 843-847.

Armanda, D.T., Guinée, J.B., Tukker, A., 2019. The second green revolution: Innovative urban agriculture's contribution to food security and sustainability – A review. Global Food Security. 22, 13-24.

Arthur, R., 2009. Omega-3 sources. Journal of Complementary Medicine. 8, 28.

Ayer, N.W., Tyedmers, P.H., Pelletier, N.L., Sonesson, U., Scholz, A., 2007. Co-product allocation in life cycle assessments of seafood production systems: Review of problems and strategies. International Journal of Life Cycle Assessment. 12, 480-487.

Bamsey, M., Berinstain, A., Graham, T., Neron, P., Giroux, R., Braham, S., Ferl, R., Paul, A.L., Dixon, M., 2009. Developing strategies for automated remote plant production systems: Environmental control and monitoring of the Arthur Clarke Mars Greenhouse in the Canadian High Arctic. Advances in Space Research. 44, 1367-1381.

Bang, A., Gronkjaer, P., Malte, H., 2004. Individual variation in the rate of oxygen consumption by zebrafish embryos. Journal of Fish Biology. 64, 1285-1296.

Barroso, F.G., de Haro, C., Sanchez-Muros, M.J., Venegas, E., Martinez-Sanchez, A., Perez-Banon, C., 2014. The potential of various insect species for use as food for fish. Aquaculture. 422, 193-201.

Basilevsky, A.T., Abdrakhimov, A.M., Dorofeeva, V.A., 2012. Water and other volatiles on the moon: A review. Solar System Research. 46, 89-107.

Batista, S., Pintado, M., Marques, A., Abreu, H., Silva, J.L., Jessen, F., Tulli, F., Valente, L.M.P., 2020a. Use of technological processing of seaweed and microalgae as strategy to improve their apparent digestibility coefficients in European seabass (Dicentrarchus labrax) juveniles. Journal of Applied Phycology. 32, 3429-3446.

Batista, S., Pereira, R., Oliveira, B., Baião, L.F., Jessen, F., Tulli, F., Messina, M., Silva, J.L., Abreu, H., Valente, L.M.P., 2020b. Exploring the potential of seaweed Gracilaria gracilis and microalga Nannochloropsis oceanica, single or blended, as natural dietary ingredients for European seabass Dicentrarchus labrax. Journal of Applied Phycology. 32, 2041-2059.

Becker, E.W., 2007. Micro-algae as a source of protein. Biotechnology Advances. 25, 207-210.

Besson, M., Allal, F., Chatain, B.a., Vergnet, A., Clota, F., Vandeputte, M., 2019. Combining Individual Phenotypes of Feed Intake With Genomic Data to Improve Feed Efficiency in Sea Bass. Frontiers in Genetics. 10.

Black, S., Larkin, K., Jacqmotte, N., Wassersug, R., Pronych, S., Souza, K., 1995. Regulative development of *Xenopus laevis* in microgravity in: Todd, P., Anton, H.J., Barlow, P.W., Gerzer, R., Heim, J.M., HemmersbachKrause, R., Slenzka, K., Kordyum, E., Duke, P.J., Duprat, A.M. (Eds.), Life and Gravity: Physiological and Morphological Responses, pp. 209-217.

Blancheton, J.P., 2000. Developments in recirculation systems for Mediterranean fish species. Aquacultural Engineering. 22, 17-31.

Blancheton, J.P., Bosc, P., Jerome, H., d'Orbcastel, E., Romain, D., 2009. Tendances pour la pisciculture européenne de demain : cages au large, systèmes en eau recirculée et systèmes intégrés. Cahiers Agricultures. 18, 227-234.

Blancheton, J.P., Attramadal, K.J.K., Michaud, L., d'Orbcastel, E.R., Vadstein, O., 2013. Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication. Aquacultural Engineering. 53, 30-39.

Bluem, V., Paris, F., 2001a. Aquatic food production modules in bioregenerative life support systems based on higher plants. Advances in Space Research. 27, 1513-1522.

Bluem, V., Paris, F., 2001b. Aquatic modules for bioregenerative life support systems based on the CEBAS biotechnilogy. Acta Astronautica. 48, 287-297.

Bluem, V., Andriske, M., Paris, F., Voeste, D., 2000. The CEBAS-Minimodule: Behaviour of an artificial aquatic ecological system during spaceflight. in: Tibbitts, T.W., Wheeler, R.M., Mitchell, C.A., Heidmann, J. (Eds.), Life Sciences: Space Life Support Systems and the Lunar Farside Crater Saha Proposal, pp. 253-262.

Blum, V., 2003. Aquatic modules for bioregenerative life support systems: Developmental aspects based on the space flight results of the CEBAS mini-module. in: Nelson, M., Pechurkin, N.S., Dempster, W.F., Somova, L.A., Shea, M.A. (Eds.), Space Life Sciences: Closed Artificial Ecosystems and Life Support Systems, pp. 1683-1691.

Blum, V., Kreuzberg, K., Stretzke, E., 1994. CEBAS MINI MODULE - TEST-RESULTS OF AN ARTIFICIAL (MAN-MADE) AQUATIC ECOSYSTEM. in: MacElroy, R.D., Mitchell, C.A., Andre, M., Blackwell, C.C., Tibbitts, T.W., Banin, A., Levine, J.S. (Eds.), Life Sciences and Space Research Xxv. Pergamon Press Ltd, Oxford, pp. 89-98.

Blum, V., Andriske, M., Kreuzberg, K., Schreibman, M.P., 1995. Animal protein production modules in biological life support systems: Novel combined aquaculture techniques based on the closed equilibrated biological aquatic system (CEBAS). Acta Astronautica. 36, 615-623.

Blüm, V., Gitelson, J.I., Horneck, G., Kreuzberg, K., 1994. Opportunities and constraints of closed man-made ecological systems on the moon. Advances in Space Research. 14, 271-280.

Bonnefoy, J., Ghislin, S., Beyrend, J., Coste, F., Calcagno, G., Lartaud, I., Gauquelin-Koch, G., Poussier, S., Frippiat, J.-P., 2021. Gravitational Experimental Platform for Animal Models, a New Platform at ESA's Terrestrial Facilities to Study the Effects of Micro- and Hypergravity on Aquatic and Rodent Animal Models. International Journal of Molecular Sciences. 22, 2961.

Brayner, R., Coute, A., Livage, J., Perrette, C., Sicard, C., 2011. Micro-algal biosensors. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 401, 581-597.

Brungs, S., Hauslage, J., Hilbig, R., Hemmersbach, R., Anken, R., 2011. Effects of simulated weightlessness on fish otolith growth: Clinostat versus Rotating-Wall Vessel. Advances in Space Research. 48, 792-798.

Brydon, L., Edwards, S., Jia, H., Mohamed-Ali, V., Zachary, I., Martin, J.F., Steptoe, A., 2005. Psychological stress activates interleukin-1beta gene expression in human mononuclear cells. Brain Behav Immun. 19, 540-546.
Buchheim, J.I., Matzel, S., Rykova, M., Vassilieva, G., Ponomarev, S., Nichiporuk, I., Horl, M., Moser, D., Biere, K., Feuerecker, M., Schelling, G., Thieme, D., Kaufmann, I., Thiel, M., Chouker, A., 2019. Stress Related Shift Toward Inflammaging in Cosmonauts After Long-Duration Space Flight. Frontiers in Physiology. 10.
Cadek, O., Tobie, G., Van Hoolst, T., Masse, M., Choblet, G., Lefevre, A., Mitri, G., Baland, R.M., Behounkova, M., Bourgeois, O., Trinh, A., 2016. Enceladus's internal ocean and ice shell constrained from Cassini gravity, shape, and libration data. Geophysical Research Letters. 43, 5653-5660.
Calla, O.P.N., Mathur, S., Gadri, K.L., 2016. Quantification of Water Ice in the Hermite-A Crater of the Lunar North Pole. Ieee Geoscience and Remote Sensing Letters. 13, 926-930.
Carbone, D., Faggio, C., 2016. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of Sparus aurata and Dicentrarchus labrax. Fish & Shellfish Immunology. 54, 172-178.
Cardinaletti, G., Messina, M., Bruno, M., Tulli, F., Poli, B.M., Giorgi, G., Chini-Zittelli, G., Tredici, M., Tibaldi, E., 2018. Effects of graded levels of a blend of Tisochrysis lutea and Tetraselmis suecica dried biomass on growth and muscle tissue composition of European sea bass (Dicentrarchus labrax) fed diets low in fish meal and oil. Aquaculture. 485, 173-182.
Carney, L.T., Lane, T.W., 2014. Parasites in algae mass culture. Frontiers in Microbiology. 5.
Castro, C., Coutinho, F., Iglesias, P., Oliva-Teles, A., Couto, A., 2020. Chlorella sp. and Nannochloropsis sp. Inclusion in Plant-Based Diets Modulate the Intestine and Liver Antioxidant Mechanisms of European Sea Bass Juveniles. Frontiers in Veterinary Science. 7.
Castro, C., Couto, A., Perez-Jimenez, A., Serra, C.R., Diaz-Rosales, P., Fernandes, R., Corraze, G., Panserat, S., Oliva-Teles, A., 2016. Effects of fish oil replacement by vegetable oil blend on digestive enzymes and tissue histomorphology of European sea bass (Dicentrarchus labrax) juveniles. Fish Physiology and Biochemistry. 42, 203-217.
Chancellor, J.C., Blue, R.S., Cengel, K.A., Aunon-Chancellor, S.M., Rubins, K.H., Katzgraber, H.G., Kennedy, A.R., 2018. Limitations in predicting the space radiation health risk for exploration astronauts. Npj Microgravity. 4.
Chary, K., Aubin, J., Sadoul, B., Fiandrino, A., Coves, D., Callier, M.D., 2020. Integrated multi-trophic aquaculture of red drum (Sciaenops ocellatus) and sea cucumber (Holothuria scabra): Assessing bioremediation and life-cycle impacts. Aquaculture. 516.
Chatani, M., Mantoku, A., Takeyama, K., Abduweli, D., Sugamori, Y., Aoki, K., Ohya, K., Suzuki, H., Uchida, S., Sakimura, T., Kono, Y., Tanigaki, F., Shirakawa, M., Takano, Y., Kudo, A., 2015. Microgravity promotes osteoclast activity in medaka fish reared at the international space station. Scientific Reports. 5, 14172.
Chatani, M., Morimoto, H., Takeyama, K., Mantoku, A., Tanigawa, N., Kubota, K., Suzuki, H., Uchida, S., Tanigaki, F., Shirakawa, M., Gusev, O., Sychev, V., Takano, Y., Itoh, T., Kudo, A., 2016. Acute transcriptional up-regulation specific to osteoblasts/osteoclasts in medaka fish immediately after exposure to microgravity. Scientific Reports. 6.
Cho, C.Y., Slinger, S.J., Bayley, H.S., 1982. Bioenergetics of salmonid fishes: Energy intake, expenditure and productivity. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry. 73, 25-41.
Cho, S.H., Ji, S.C., Hur, S.B., Bae, J., Park, I.S., Song, Y.C., 2007. Optimum temperature and salinity conditions for growth of green algae Chlorella ellipsoidea and Nannochloris oculata. Fisheries Science. 73, 1050-1056.
Chopin, T., Yarish, C., Sharp, G., 2000. Beyond the monospecific approach to animal aquaculture - The light of integrated multi-trophic aquaculture, Symposium on Ecological and Genetic Implications

of Aquaculture Activities held at the Annual Meeting of the World-Aquaculture-Society, Nice, FRANCE, pp. 447-+.
Chopin, T., Cooper, J.A., Reid, G., Cross, S., Moore, C., 2012. Open-water integrated multi-trophic aquaculture: environmental biomitigation and economic diversification of fed aquaculture by extractive aquaculture. Reviews in Aquaculture. 4, 209-220.
Combe, M., Reverter, M., Caruso, D., Pepey, E., Gozlan, R., 2023. Impact of Global Warming on the Severity of Viral Diseases: A Potentially Alarming Threat to Sustainable Aquaculture Worldwide. Microorganisms. 11, 1049.
Cooper, M., Perchonok, M., Douglas, G.L., 2017. Initial assessment of the nutritional quality of the space food system over three years of ambient storage. Npj Microgravity. 3.
Corraze, G., Kaushik, S., 2009. Lipid nutrition and fish oil replacement by vegetable oils in pisciculture. Cahiers Agricultures. 18, 112-118.
Craggs, R., Park, J., Heubeck, S., Sutherland, D., 2014. High rate algal pond systems for low-energy wastewater treatment, nutrient recovery and energy production. New Zealand Journal of Botany. 52, 60-73.
Crucian, B.E., Zwart, S.R., Mehta, S., Uchakin, P., Quiriarte, H.D., Pierson, D., Sams, C.F., Smith, S.M., 2014. Plasma Cytokine Concentrations Indicate That In Vivo Hormonal Regulation of Immunity Is Altered During Long-Duration Spaceflight. Journal of Interferon and Cytokine Research. 34, 778-786.
Cucchi, P., Sucre, E., Santos, R., Leclere, J., Charmantier, G., Castille, R., 2012. Embryonic development of the sea bass Dicentrarchus labrax. Helgoland Marine Research. 66, 199-209.
Dallaire, V., Lessard, P., Vandenberg, G., de la Noue, J., 2007. Effect of algal incorporation on growth, survival and carcass composition of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fry. Bioresource Technology. 98.
de Vera, J.P., Alawi, M., Backhaus, T., Baque, M., Billi, D., Bottger, U., Berger, T., Bohmeier, M., Cockell, C., Demets, R., Noetzel, R.D., Edwards, H., Elsaesser, A., Fagliarone, C., Fiedler, A., Foing, B., Foucher, F., Fritz, J., Hanke, F., Herzog, T., Horneck, G., Hubers, H.W., Huwe, B., Joshi, J., Kozyrovska, N., Kruchten, M., Lasch, P., Lee, N., Leuko, S., Leya, T., Lorek, A., Martinez-Frias, J., Meessen, J., Moritz, S., Moeller, R., Olsson-Francis, K., Onofri, S., Ott, S., Pacelli, C., Podolich, O., Rabbow, E., Reitz, G., Rettberg, P., Reva, O., Rothschild, L., Sancho, L.G., Schulze-Makuch, D., Selbmann, L., Serrano, P., Szewzyk, U., Verseux, C., Wadsworth, J., Wagner, D., Westall, F., Wolter, D., Zucconi, L., 2019. Limits of Life and the Habitability of Mars: The ESA Space Experiment BIOMEX on the ISS. Astrobiology. 19, 145-157.
de Verdal, H., Komen, H., Quillet, E., Chatain, B., Allal, F., Benzie, J.A.H., Vandeputte, M., 2018. Improving feed efficiency in fish using selective breeding: a review. Reviews in Aquaculture. 10, 833-851.
Devauchelle, N., Coves, D., 1988. The characteristics of sea bass (Dicentrarchus labrax) eggs: description, biochemical composition and hatching performances. Aquat. Living Resour. 1, 223-230.
Deviller, G., Aliaume, C., Nava, M.A.F., Casellas, C., Blancheton, J.P., 2004. High-rate algal pond treatment for water reuse in an integrated marine fish recirculating system: effect on water quality and sea bass growth. Aquaculture. 235, 331-344.
Di Bella, M.L., Vazzana, M., Vizzini, A., Parrinello, N., 2008. Glucocorticoid receptor (DlGR1) is expressed in pre-larval and larval stages of the teleost fish Dicentrarchus labrax. Cell Tissue Res. 333, 39-47.
Dosdat, A., Servais, F., Métailler, R., Huelvan, C., Desbruyères, E., 1996. Comparison of nitrogenous losses in five teleost fish species. Aquaculture. 141, 107-127.
Douglas, G.L., Zwart, S.R., Smith, S.M., 2020. Space Food for Thought: Challenges and Considerations for Food and Nutrition on Exploration Missions. Journal of Nutrition. 150, 2242-2244.

Edsall, S.C., Franz-Odendaal, T.A., 2014. An Assessment of the Long-Term Effects of Simulated Microgravity on Cranial Neural Crest Cells in Zebrafish Embryos with a Focus on the Adult Skeleton. Plos One. 9.
Eke, V.R., Bartram, S.A., Lane, D.A., Smith, D., Teodoro, L.F.A., 2014. Lunar polar craters - Icy, rough or just sloping? Icarus. 241, 66-78.
El-Nakhel, C., Giordano, M., Pannico, A., Carillo, P., Fusco, G.M., De Pascale, S., Rouphael, Y., 2019. Cultivar-Specific Performance and Qualitative Descriptors for Butterhead Salanova Lettuce Produced in Closed Soilless Cultivation as a Candidate Salad Crop for Human Life Support in Space. Life-Basel. 9.
Elissen, H.J.H., Hendrickx, T.L.G., Temmink, H., Laarhoven, B., Buisman, C.J.N., 2015. Worm-it: converting organic wastes into sustainable fish feed by using aquatic worms. Journal of Insects as Food and Feed. 1, 67-74.
Endo, M., Kobayashi, R., Ariga, K., Yoshizaki, G., Takeuchi, T., 2002. Postural control in tilapia under microgravity and the near infrared irradiated conditions. Nippon Suisan Gakkaishi. 68, 887-892.
EUFOMA, 2020. Blue economy report. in: products., E.m.o.f.f.a.a. (Ed.).
Fahrion, J., Mastroleo, F., Dussap, C.-G., Leys, N., 2021. Use of Photobioreactors in Regenerative Life Support Systems for Human Space Exploration. Frontiers in Microbiology. 12.
FAO, 2012. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture

Rome, pp. 261.
FAO, 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. FAO #227.
FAO, 2022. La Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2022. Vers une transformation bleue. Rome, . FAO, Rome, Italy.
Finn, R.N., Widdows, J., Fyhn, H.J., 1995a. Calorespirometry of developping embryos and yolk-sac larvae of turbot (*Scophtalmus maximus*). Marine Biology. 122, 157-163.
Finn, R.N., Fyhn, H.J., Evjen, M.S., 1995b. Physiological energetics of developing embryos and yolk-sac larvae of Atlantic cod (Gadus morhua) .1. Respiration and nitrogen metabolism. Marine Biology. 124, 355-369.
Fonte, C., Kaminski, S., Vanet, A., Lanfumey, L., Cohen-Salmon, C., Ghislin, S., Frippiat, J.P., 2019. Socioenvironmental stressors encountered during spaceflight partially affect the murine TCR-β repertoire and increase its self-reactivity. Faseb j. 33, 896-908.
Franco-Nava, M.A., Blancheton, J.P., Deviller, G., Le-Gall, J.Y., 2004. Particulate matter dynamics and transformations in a recirculating aquaculture system: application of stable isotope tracers in seabass rearing. Aquacultural Engineering. 31, 135-155.
Gagnaire, B., Cavalie, I., Pereira, S., Floriani, M., Dubourg, N., Camilleri, V., Adam-Guillermin, C., 2015. External gamma irradiation-induced effects in early-life stages of zebrafish, Danio rerio. Aquatic Toxicology. 169, 69-78.
Galasso, H.L., Lefebvre, S., Aliaume, C., Sadoul, B., Callier, M.D., 2020. Using the Dynamic Energy Budget theory to evaluate the bioremediation potential of the polychaete Hediste diversicolor in an integrated multi-trophic aquaculture system. Ecological Modelling. 437.
Gales, A., Triplet, S., Geoffroy, T., Roques, C., Carre, C., Le Floc'h, E., Lanfranchi, M., Simier, M., d'Orbcastel, E.R., Przybyla, C., Fouilland, E., 2020. Control of the pH for marine microalgae polycultures: A key point for CO2 fixation improvement in intensive cultures. Journal of Co2 Utilization. 38, 187-193.
Gamble, M.M., Sarker, P.K., Kapuscinski, A.R., Kelson, S., Fitzgerald, D.S., Schelling, B., De Souza, A.V.B., Tsukui, T., 2021. Toward environmentally sustainable aquafeeds: Managing phosphorus discharge from Nile tilapia (Oreochromis niloticus) aquaculture with microalgae-supplemented diets. Elementa: Science of the Anthropocene. 9.
Geffroy, B., Gesto, M., Clota, F., Aerts, J., Darias, M.J., Blanc, M.O., Ruelle, F., Allal, F., Vandeputte, M., 2021. Parental selection for growth and early-life low stocking density increase the female-to-male ratio in European sea bass. Scientific Reports. 11.

Gilles, S., Fargier, L., Lazzaro, X., Baras, E., De Wilde, N., Drakidès, C., Amiel, C., Rispal, B., Blancheton, J.P., 2013. An integrated fish–plankton aquaculture system in brackish water. Animal. 7, 322-329.
Goikoetxea, A., Sadoul, B., Blondeau-Bidet, E., Aerts, J., Blanc, M.-O., Parrinello, H., Barrachina, C., Pratlong, M., Geffroy, B., 2021. Genetic pathways underpinning hormonal stress responses in fish exposed to short- and long-term warm ocean temperatures. Ecological Indicators. 120, 106937.
Gonzales, J.M., 2009. Aquaculture in bio-regenerative life support systems (BLSS): Considerations. Advances in Space Research. 43, 1250-1255.
Gonzales, J.M., Brown, P.B., 2006. Nile tilapia Oreochromis niloticus as a food source in advanced life support systems: Initial considerations. Advances in Space Research. 38, 1132-1137.
Granada, L., Lopes, S., Novais, S.C., Lemos, M.F.L., 2018. Modelling integrated multi-trophic aquaculture: Optimizing a three trophic level system. Aquaculture. 495, 90-97.
Greene, C.H., Huntley, M.E., Archibald, I., Gerber, L.N., Sills, D.L., Granados, J., Tester, J.W., Beal, C.M., Walsh, M.J., Bidigare, R.R., Brown, S.L., Cochlan, W.P., Johnson, Z.I., Lei, X.G., Machesky, S.C., Redalje, D.G., Richardson, R.E., Kiron, V., Corless, V., 2016. Marine Microalgae climate, energy and food security from the sea Oceanography. 29, 10-15.
Gregory, M.K., Collins, R.O., Tocher, D.R., James, M.J., Turchini, G.M., 2016. Nutritional regulation of long-chain PUFA biosynthetic genes in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). British Journal of Nutrition. 115, 1721-1729.
Gretebeck, R.J., Siconolfi, S.F., Rice, B., Lane, H.W., 1994. Physical performance is maintened in women consuming only food used on the US space shuttle. Aviation Space and Environmental Medicine. 65, 1036-1040.
Guo, Z., Phooi, W.B.A., Lim, Z.J., Tong, Y.W., 2015. Control of CO2 input conditions during outdoor culture of Chlorella vulgaris in bubble column photobioreactors. Bioresource Technology. 186, 238-245.
Haas, S., Bauer, J.L., Adakli, A., Meyer, S., Lippemeier, S., Schwarz, K., Schulz, C., 2015. Marine microalgae Pavlova viridis and Nannochloropsis sp. as n-3 PUFA source in diets for juvenile European sea bass (Dicentrarchus labrax L.). Journal of Applied Phycology. 28, 1011-1021.
Hader, D.P., Richter, P.R., Strauch, S.M., Schuster, M., 2006. Aquacells - Flagellates under long-term microgravity and potential usage for life support systems. Microgravity Science and Technology. 18, 210-214.
Halwart, M., 2007. Cage aquaculture: Regional review and global overview. in: FAO (Ed.), ROME.
Harpaz, S., Uni, Z., 1999. Activity of intestinal mucosal brush border membrane enzymes in relation to the feeding habits of three aquaculture fish species. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 124, 155-160.
Harpaz, S., Hakim, Y., Slosman, T., Eroldogan, O.T., 2005. Effects of adding salt to the diet of Asian sea bass Lates calcarifer reared in fresh or salt water recirculating tanks, on growth and brush border enzyme activity. Aquaculture. 248, 315-324.
Hassoun, A.E., Gemayel, E., Krasakopoulou, E., Goyet, C., Saab, M.A.A., Guglielmi, V., Touratier, F., Falco, C., 2015. Acidification of the Mediterranean Sea from anthropogenic carbon penetration. Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers. 102, 1-15.
Hemmersbach, R., Häder, D.-P., Braun, M., 2018. Methods for Gravitational Biology Research. in: Braun, M., Böhmer, M., Häder, D.-P., Hemmersbach, R., Palme, K. (Eds.), Gravitational Biology I: Gravity Sensing and Graviorientation in Microorganisms and Plants. Springer International Publishing, Cham, pp. 13-26.
Hermannsdottir, R., Johannsdottir, J., Smaradottir, H., Sigurgisladottir, S., Gudmundsdottir, B.K., Bjornsdottir, R., 2009. Analysis of effects induced by a pollock protein hydrolysate on early development, innate immunity and the bacterial community structure of first feeding of Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus L.) larvae. Fish & Shellfish Immunology. 27, 595-602.

Herranz, R., Anken, R., Boonstra, J., Braun, M., Christianen, P.C., de Geest, M., Hauslage, J., Hilbig, R., Hill, R.J., Lebert, M., Medina, F.J., Vagt, N., Ullrich, O., van Loon, J.J., Hemmersbach, R., 2013. Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. Astrobiology. 13, 1-17.
Hilbig, R.W., Anken, R.H., 2017. Impact of Micro- and Hypergravity on Neurovestibular Issues of Fish, Sensory Motor and Behavioral Research in Space, pp. 59-86.
Hoffman, R.B., Salinas, G.A., Baky, A.A., 1977. Behavioral analyses of killifish exposed to weightlessness in Apollo-Soyuz test project Aviation Space and Environmental Medicine. 48, 712-717.
Honniball, C., Lucey, P., Li, S., Shenoy, S., Orlando, T., Hibbitts, C., Hurley, D., Farrell, W., 2021. Molecular water detected on the sunlit Moon by SOFIA. Nature Astronomy. 5, 1-7.
Ibsch, M., Anken, R.H., Rahmann, H., 2000. Weightlessness during spaceflight results in enhanced synapse formation in a fish brain vestibular nucleus. Neuroscience Letters. 296, 13-16.
Ijiri, K., 1998. Development of space-fertilized eggs and formation of primordial germ cells in the embryos of Medaka fish. Advanced Space Research. 21, 1155-1158.
Ijiri, K., Mizuno, R., Eguchi, H., 2003. Use of an otolith-deficient mutant in studies of fish behavior in microgravity. in: Bruce, L.L., Ijiri, K., Perbal, G. (Eds.), Space Life Sciences: Gravitational Biology: 2002, pp. 1501-1512.
Jobling, M., 1986. Gastrointestinal overload - A problem with formulated feeds. Aquaculture. 51, 257-263.
Kalousova, K., Soucek, O., Tobie, G., Choblet, G., Cadek, O., 2016. Water generation and transport below Europa's strike-slip faults. Journal of Geophysical Research-Planets. 121, 2444-2462.
Karya, N., van der Steen, N.P., Lens, P.N.L., 2013. Photo-oxygenation to support nitrification in an algal-bacterial consortium treating artificial wastewater. Bioresource Technology. 134, 244-250.
Katayama, T., Nagao, N., Kasan, N.A., Khatoon, H., Rahman, N.A., Takahashi, K., Furuya, K., Yamada, Y., Wahid, M.E.A., Jusoh, M., 2020. Bioprospecting of indigenous marine microalgae with ammonium tolerance from aquaculture ponds for microalgae cultivation with ammonium-rich wastewaters. Journal of Biotechnology. 323, 113-120.
Kaushik, S., 2014. Contribution of fish farming to human nutrition. Cahiers Agricultures. 23, 18-23.
Kaushik, S.J., Gouillou-Coustans, M.F., Cho, C.Y., 1998. Application of the recommendations on vitamin requirements of finfish by NRC (1993) to salmonids and sea bass using practical and purified diets. Aquaculture. 161, 463-474.
Kerrigan, D., Suckling, C.C., 2018. A meta-analysis of integrated multitrophic aquaculture: extractive species growth is most successful within close proximity to open-water fish farms. Reviews in Aquaculture. 10, 560-572.
Khodadad, C.L.M., Hummerick, M.E., Spencer, L.E., Dixit, A.R., Richards, J.T., Romeyn, M.W., Smith, T.M., Wheeler, R.M., Massa, G.D., 2020. Microbiological and Nutritional Analysis of Lettuce Crops Grown on the International Space Station. Frontiers in Plant Science. 11.
Kiøarboe, T., Møhlenberg, F., 1987. Partitioning of oxygen consumption between “maintenance” and “growth” in developing herring Clupea harengus (L.) embryos. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 111, 99-108.
Kiron, V., Phromkunthong, W., Huntley, M., Archibald, I., De Scheemaker, G., 2012. Marine microalgae from biorefinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and whiteleg shrimp. Aquaculture Nutrition. 18, 521-531.
Klykken, C., Reed, A.K., Dalum, A.S., Olsen, R.E., Moe, M.K., Attramadal, K.J.K., Boissonnot, L., 2022. Physiological changes observed in farmed Atlantic salmon (Salmo salar L.) with nephrocalcinosis. Aquaculture. 554.
Knutsen, H.R., Johnsen, I.H., Keizer, S., Sørensen, M., Roques, J.A.C., Hedén, I., Sundell, K., Hagen, Ø., 2019. Fish welfare, fast muscle cellularity, fatty acid and body-composition of juvenile

spotted wolffish (Anarhichas minor) fed a combination of plant proteins and microalgae (Nannochloropsis oceanica). Aquaculture. 506, 212-223.
König, B., Janker, J., Reinhardt, T., Villarroel, M., Junge, R., 2018. Analysis of aquaponics as an emerging technological innovation system. Journal of Cleaner Production. 180, 232-243.
Krieger, S.S., Zwart, S.R., Mehta, S., Wu, H.L., Simpson, R.J., Smith, S.M., Crucian, B., 2021. Alterations in Saliva and Plasma Cytokine Concentrations During Long-Duration Spaceflight. Frontiers in Immunology. 12.
Kyaw, T.Y., Ng, A.K., 2017. Smart Aquaponics System for Urban Farming. Energy Procedia. 143, 342-347.
Laine, C., Ollikainen, M., Kankainen, M., Setala, J., Vielma, J., 2023. Social net benefits from aquaculture production: A comparison of net cage cultivation and recirculating aquaculture systems. Aquaculture Economics & Management.
Lange, S., Bambir, S., Dodds, A.W., Magnadóttir, B., 2004. The ontogeny of complement component C3 in Atlantic cod (Gadus morhua L.)—an immunohistochemical study. Fish & Shellfish Immunology. 16, 359-367.
Lee, J.W., Lee, Y.M., Lee, J.H., Noh, J.K., Kim, H.C., Park, C.J., Park, J.W., Hwang, I.J., Kim, S.Y., 2013. The Expression Analysis of Complement Component C3 during Early Developmental Stages in Olive Flounder (Paralichthys olivaceus). Dev Reprod. 17, 311-319.
Liu, H., Yu, C.Y., Manukovsky, N.S., Kovalev, V.S., Gurevich, Y.L., Wang, J., 2008. A conceptual configuration of the lunar base bioregenerative life support system including soil-like substrate for growing plants. Advances in Space Research. 42, 1080-1088.
Liu, L.G., 2019. Origin and early evolution of terrestrial planet atmospheres and oceans. Terr. Atmos. Ocean. Sci. 30, 765-770.
Liu, Y., Guan, Y.B., Zhang, Y.X., Rossman, G.R., Eiler, J.M., Taylor, L.A., 2012. Direct measurement of hydroxyl in the lunar regolith and the origin of lunar surface water. Nature Geoscience. 5, 779-782.
Løvoll, M., Kilvik, T., Boshra, H., Bogwald, J., Sunyer, J.O., Dalmo, R.A., 2006. Maternal transfer of complement components C3-1, C3-3, C3-4, C4, C5, C7, Bf, and Df to offspring in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Immunogenetics. 58, 168-179.
Løvoll, M., Johnsen, H., Boshra, H., Bogwald, J., Sunyer, J.O., Dalmo, R.A., 2007. The ontogeny and extrahepatic expression of complement factor C3 in Atlantic salmon (Salmo salar). Fish & Shellfish Immunology. 23, 542-552.
Lychakov, D.V., 2016. Behavioural and functional vestibular disorders after space flight: 2. Fish, amphibians and birds. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 52, 1-16.
Madeira, D., Araujo, J.E., Vitorino, R., Capelo, J.L., Vinagre, C., Diniz, M.S., 2016. Ocean warming alters cellular metabolism and induces mortality in fish early life stages: A proteomic approach. Environmental Research. 148, 164-176.
Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish & Shellfish Immunology. 20, 137-151.
Magnat, C., 2000. Les associations riz/aquaculture : modalités et impacts. Muséum national d'histoire naturelle, Paris, France, pp. 24.
Manna, S., Ghadei, S., Das, N., Baitha, R., Bera, A., Das, B., Patil, P., 2020. Study of drug usage in cage culture in reservoirs and wetlands.
Markou, G., Iconomou, D., Muylaert, K., 2016. Applying raw poultry litter leachate for the cultivation of Arthrospira platensis and Chlorella vulgaris. Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts. 13, 79-84.
Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L.R., 2012. World aquaculture: environmental impacts and troubleshooting alternatives. ScientificWorldJournal. 2012, 389623.
Mastellos, D.C., DeAngelis, R.A., Lambris, J.D., 2013. Complement-triggered pathways orchestrate regenerative responses throughout phylogenesis. Seminars in Immunology. 25, 29-38.

Mauri, I., Roher, N., MacKenzie, S., Romero, A., Manchado, M., Balasch, J.C., Béjar, J., Álvarez, M.C., Tort, L., 2011. Molecular cloning and characterization of European seabass (Dicentrarchus labrax) and Gilthead seabream (Sparus aurata) complement component C3. Fish & Shellfish Immunology. 30, 1310-1322.
Mazzolini, J., Chia, K., Sieger, D., 2018. Isolation and RNA Extraction of Neurons, Macrophages and Microglia from Larval Zebrafish Brains. Jove-Journal of Visualized Experiments.
McCubbin, F.M., Barnes, J.J., 2019. Origin and abundances of H2O in the terrestrial planets, Moon, and asteroids. Earth and Planetary Science Letters. 526.
Medale, F., Kaushik, S., 2008. Evolution of INRA research in the field of fish nutrition: exploring alternatives to marine fishery-derived ingredients. Productions Animales. 21, 87-94.
Meloni, M., Candusso, S., Galeotti, M., Volpatti, D., 2015. Preliminary study on expression of antimicrobial peptides in European sea bass (Dicentrarchus labrax) following in vivo infection with Vibrio anguillarum. A time course experiment. Fish & Shellfish Immunology. 43, 82-90.
Messina, M., Bulfon, C., Beraldo, P., Tibaldi, E., Cardinaletti, G., 2019. Intestinal morpho-physiology and innate immune status of European sea bass (Dicentrarchus labrax) in response to diets including a blend of two marine microalgae, Tisochrysis lutea and Tetraselmis suecica. Aquaculture. 500, 660-669.
Metaxa, E., Deviller, G., Pagand, P., Alliaume, C., Casellas, C., Blancheton, J.P., 2006. High rate algal pond treatment for water reuse in a marine fish recirculation system: Water purification and fish health. Aquaculture. 252, 92-101.
Metz, J.R., Huising, M.O., Leon, K., Verburg-van Kemenade, B.M.L., Flik, G., 2006. Central and peripheral interleukin-1 beta and interieukin-1 receptor I expression and their role in the acute stress response of common carp, Cyprinus carpio L. Journal of Endocrinology. 191, 25-35.
Milstein, A., 2005. Polyculture in aquaculture, Animal Breeding Abstracts. CABI Wallingford UK, pp. 27 pp.
Mladineo, I., Bocina, I., Przybyla, C., Fievet, J., Blancheton, J.P., 2010. Fish growth and health aspects of sea bass (Dicentrarchus labrax) reared in standard vs. high rate algal pond recirculation systems. Aquatic Living Resources. 23, 217-224.
Montemezzani, V., Duggan, I.C., Hogg, I.D., Craggs, R.J., 2017. Screening of potential zooplankton control technologies for wastewater treatment High Rate Algal Ponds. Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts. 22, 1-13.
Morais, S., Mourente, G., Martinez, A., Gras, N., Tocher, D.R., 2015. Docosahexaenoic acid biosynthesis via fatty acyl elongase and Delta 4-desaturase and its modulation by dietary lipid level and fatty acid composition in a marine vertebrate. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids. 1851, 588-597.
Mori, S., Mitarai, G., Takagi, S., Takabayashi, A., Usui, S., Nakamura, T., Sakakibara, M., Nagatomo, M., Vonbaumgarten, R.J., 1994. Space experiment using lage-sized fish : in case of carp in SPACELAB-J mission Acta Astronautica. 33, 41-47.
Murata, Y., Yasuda, T., Watanabe-Asaka, T., Oda, S., Mantoku, A., Takeyama, K., Chatani, M., Kudo, A., Uchida, S., Suzuki, H., Tanigaki, F., Shirakawa, M., Fujisawa, K., Hamamoto, Y., Terai, S., Mitani, H., 2015. Histological and Transcriptomic Analysis of Adult Japanese Medaka Sampled Onboard the International Space Station. Plos One. 10.
Mylonas, C.C., Mitrizakis, N., Castaldo, C.A., Cervino, C.P., Papadaki, M., Sigelaki, I., 2013. Reproduction of hatchery-produced meagre Argyrosomus regius in captivity II. Hormonal induction of spawning and monitoring of spawning kinetics, egg production and egg quality. Aquaculture. 414, 318-327.
Najafpour, B., Cardoso, J.C.R., Canario, A.V.M., Power, D.M., 2020. Specific Evolution and Gene Family Expansion of Complement 3 and Regulatory Factor H in Fish. Frontiers in Immunology. 11.

Nakatsuji, N., Adachi, K., Morioka, K., 2019. Long-term stability of RNA isolated from muscle of red seabream (Pagrus major) during ice storage. Fish Physiology and Biochemistry. 45, 819-828.
Niederwieser, T., Kociolek, P., Klaus, D., 2018a. A review of algal research in space. Acta Astronautica. 146, 359-367.
Niederwieser, T., Kociolek, P., Klaus, D., 2018b. Spacecraft cabin environment effects on the growth and behavior of Chlorella vulgaris for life support applications. Life Sciences in Space Research. 16, 8-17.
Niihori, M., Mogami, Y., Naruse, K., Baba, S.A., 2004. Development and swimming behavior of medaka fry in a spaceflight aboard the space shuttle Columbia (STS-107). Zoological Science. 21, 923-931.
NRC, 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. The National Academies Press, Washington, DC.
Olaizola, M., 2003. Microalgal removal of CO2 from flue gases: Changes in medium pH and flue gas composition do not appear to affect the photochemical yield of microalgal cultures. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 8, 360-367.
Olson, S.L., Jansen, M., Abbot, D.S., 2020. Oceanographic Considerations for Exoplanet Life Detection. Astrophysical Journal. 895.
Orosei, R., Lauro, S.E., Pettinelli, E., Cicchetti, A., Coradini, M., Cosciotti, B., Di Paolo, F., Flamini, E., Mattei, E., Pajola, M., Soldovieri, F., Cartacci, M., Cassenti, F., Frigeri, A., Giuppi, S., Martufi, R., Masdea, A., Mitri, G., Nenna, C., Noschese, R., Restano, M., Seu, R., 2018. Radar evidence of subglacial liquid water on Mars. Science. 361, 490-493.
Pagand, P., Blancheton, J.P., Casellas, C., 2000a. A model for predicting the quantities of dissolved inorganic nitrogen released in effluents from a sea bass (Dicentrarchus labrax) recirculating water system. Aquacultural Engineering. 22, 137-153.
Pagand, P., Blancheton, J.P., Lemoalle, J., Casellas, C., 2000b. The use of high rate algal ponds for the treatment of marine effluent from a recirculating fish rearing system. Aquaculture Research. 31, 729-736.
Palmisano, A.N., Winton, J.R., Dickhoff, W.W., 2000. Tissue-Specific Induction of Hsp90 mRNA and Plasma Cortisol Response in Chinook Salmon following Heat Shock, Seawater Challenge, and Handling Challenge. Marine Biotechnology. 2, 329-338.
Paradiso, R., Buonomo, R., De Micco, V., Aronne, G., Palermo, M., Barbieri, G., De Pascale, S., 2012. Soybean cultivar selection for Bioregenerative Life Support Systems (BLSSs) - Hydroponic cultivation. Advances in Space Research. 50, 1501-1511.
Pascon, G., Messina, M., Petit, L., Valente, L.M.P., Oliveira, B., Przybyla, C., Dutto, G., Tulli, F., 2021. Potential application and beneficial effects of a marine microalgal biomass produced in a high-rate algal pond (HRAP) in diets of European sea bass, Dicentrarchus labrax. Environmental Science and Pollution Research.
Pasparakis, C., Wang, Y., Heuer, R.M., Zhang, W., Stieglitz, J.D., McGuigan, C.J., Benetti, D.D., Scholey, V.P., Margulies, D., Grosell, M., 2022. Ultraviolet avoidance by embryonic buoyancy control in three species of marine fish. Science of The Total Environment. 806, 150542.
Pavlidis, M., Karantzali, E., Fanouraki, E., Barsakis, C., Kollias, S., Papandroulakis, N., 2011. Onset of the primary stress in European sea bass Dicentrarhus labrax, as indicated by whole body cortisol in relation to glucocorticoid receptor during early development. Aquaculture. 315, 125-130.
Perez-Pascual, D., Estelle, J., Dutto, G., Rodde, C., Bernardet, J.F., Marchand, Y., Duchaud, E., Przybyla, C., Ghigo, J.M., 2020. Growth Performance and Adaptability of European Sea Bass (Dicentrarchus labrax) Gut Microbiota to Alternative Diets Free of Fish Products. Microorganisms. 8.
Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29, e45.

Pickett, M.T., Roberson, L.B., Calabria, J.L., Bullard, T.J., Turner, G., Yeh, D.H., 2020. Regenerative water purification for space applications: Needs, challenges, and technologies towards 'closing the loop'. Life Sciences in Space Research. 24, 64-82.
Pionetti, 1983. The oxygen consumptionof sea bass *Dicentrarchus labrax* in relation to development. Oceanis. 9, 5.
Pitta, P., Tsapakis, M., Apostolaki, E.T., Tsagaraki, T., Holmer, M., Karakassis, I., 2009. 'Ghost nutrients' from fish farms are transferred up the food web by phytoplankton grazers. Marine Ecology Progress Series. 374, 1-6.
Priyadarshani, I., Rath, B., 2012. Commercial and industrial applications of micro algae - A review.
Przybyla, C., 2021. Space Aquaculture: Prospects for Raising Aquatic Vertebrates in a Bioregenerative Life-Support System on a Lunar Base. Frontiers in Astronomy and Space Sciences. 8.
Przybyla, C., Dutto, G., Bernard, M., Rollin, B., Laurand, X., Averseng, J., Gasset, E., Tadadjeu, I., Dusseau, L., 2020. European sea bass (Dicentrarchus labrax) and meagre (Argyrosomus regius) fertilized egg resistance to a spacecraft launcher vibration qualifying test. Aquaculture International.
Przybyla, C., Bonnefoy, J., Paounov, R., Debiol, A., Dutto, G., Mansuy, E., Lallement, S., Coste, F., Geffroy, B., Frippiat, J.P., 2023. Embryogenesis of an aquaculture fish (Dicentrarchus labrax) under simulated altered gravity. Frontiers in Space Technologies. 4.
Putrevu, D., Das, A., Vachhani, J.G., Trivedi, S., Misra, T., 2016. Chandrayaan-2 dual-frequency SAR: Further investigation into lunar water and regolith. Advances in Space Research. 57, 627-646.
Quinton, R., 1912. L'eau de mer, milieu organique. Masson et Cie. Editeurs, Paris.
Rahmann, H., Anken, R.H., 2002. Gravity related research with fishes - Perspectives in regard to the upcoming International Space Station, ISS. in: Ijiri, K., Slenzka, K., Kronenberg, A. (Eds.), Space Life Sciences: Biological Research and Space Radiation, pp. 697-710.
Régnier, T., Bolliet, V., Labonne, J., Gaudin, P., 2010. Assessing maternal effects on metabolic rate dynamics along early development in brown trout (Salmo trutta): an individual-based approach. Journal of Comparative Physiology B. 180, 25-31.
Reid, G.K., Chopin, T., Robinson, S.M.C., Azevedo, P., Quinton, M., Belyea, E., 2013. Weight ratios of the kelps, Alaria esculenta and Saccharina latissima, required to sequester dissolved inorganic nutrients and supply oxygen for Atlantic salmon, Salmo salar, in Integrated Multi-Trophic Aquaculture systems. Aquaculture. 408, 34-46.
Reverter, M., Sarter, S., Caruso, D., Avarre, J.-C., Combe, M., Pepey, E., Pouyaud, L., Vega-Heredía, S., de Verdal, H., Gozlan, R.E., 2020. Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. Nature Communications. 11, 1870.
Reyes-López, F.E., Aerts, J., Vallejos-Vidal, E., Ampe, B., Dierckens, K., Tort, L., Bossier, P., 2018. Modulation of Innate Immune-Related Genes and Glucocorticoid Synthesis in Gnotobiotic Full-Sibling European Sea Bass (Dicentrarchus labrax) Larvae Challenged With Vibrio anguillarum. Front Immunol. 9, 914.
Ritchie, R.J., 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. Photosynthesis Research. 89, 27-41.
Roblin, J., 2019. Bioremédiation de la ferme de Douhet par un AMTI, Epurval2.
Rodríguez-Zaragoza, S., 1994. Ecology of Free-Living Amoebae. Critical Reviews in Microbiology. 20, 225-241.
Rutherford, S.L., Lindquist, S., 1998. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. Nature. 396, 336-342.
Saavedra, M., Grade, A., Candeias-Mendes, A., Pereira, T.G., Teixeira, B., Yufera, M., Conceicao, L.E.C., Mendes, R., Pousao-Ferreira, P., 2016. Different dietary protein levels affect meagre (Argyrosomus regius) larval survival and muscle cellularity. Aquaculture. 450, 89-94.
Sadoul, B., Geffroy, B., 2019. Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. Journal of Fish Biology. 94, 540-555.

Sadoul, B., Caprioli, J.P., Barrier-Loiseau, C., Cimiterra, N., Laugier, T., Lagarde, F., Chary, K., Callier, M.D., Guillermard, M.O., d'Orbcastel, E.R., 2022. Is Holothuria tubulosa the golden goose of ecological aquaculture in the Mediterranean Sea? Aquaculture. 554.
Saka, Ş., Fırat, M.K., Kamaci, H.O., 2001. The Development of European Sea Bass (Dicentrarchus labrax L., 1758) Eggs in Relation to Temperature. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 25, 139-147.
Salazar Moscoso, M., Joly Ruiz Castellanos, S., Anglada Escudé, G., Ribas Cabezas, L., 2022. Hypergravity induces changes in physiology, gene expression and epigenetics in zebrafish, 4th Symposium on Space Educational Activities. Universitat Politècnica de Catalunya.
Santigosa, E., Garcia-Meilan, I., Maria Valentin, J., Navarro, I., Perez-Sanchez, J., Angeles Gallardo, M., 2011. Plant oils' inclusion in high fish meal-substituted diets: effect on digestion and nutrient absorption in gilthead sea bream (Sparus aurata L.). Aquaculture Research. 42, 962-974.
Scapigliati, G., Carcupino, M., Taddei, A.R., Mazzini, M., 1994. Characterization of the main egg envelope proteins of the sea bass (Dicentrarchus labrax L (teleostea serraniidae) Molecular Reproduction and Development. 38, 48-53.
Scheld, H.W., Boyd, J.F., Bozarth, G.A., Conner, J., Eichler, V.B., Fuller, P.M., Hoffman, R.B., Keefe, J.R., Kuchnow, K.P., Oppenheimer, J.M., 1976. Killifish Hatching and Orientation experiment MA-161.
Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., Ragg, T., 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Molecular Biology. 7, 3.
Sebastian, C., Esseling, K., Horn, E., 2001. Altered gravitational forces affect the development of the static vestibuloocular reflex in fish (Oreochromis mossambicus). J Neurobiol. 46, 59-72.
Serradell, A., Torrecillas, S., Makol, A., Valdenegro, V., Fernández-Montero, A., Acosta, F., Izquierdo, M.S., Montero, D., 2020. Prebiotics and phytogenics functional additives in low fish meal and fish oil based diets for European sea bass (Dicentrarchus labrax): Effects on stress and immune responses. Fish & Shellfish Immunology. 100, 219-229.
Shafique, L., Abdel-Latif, H.M.R., Faiz-ul, H., Alagawany, M., Naiel, M.A.E., Dawood, M.A.O., Yilmaz, S., Liu, Q.Y., 2021. The Feasibility of Using Yellow Mealworms (Tenebrio molitor): Towards a Sustainable Aquafeed Industry. Animals. 11.
Simon, O., Massarin, S., Coppin, F., Hinton, T.G., Gilbin, R., 2011. Investigating the embryo/larval toxic and genotoxic effects of gamma irradiation on zebrafish eggs. Journal of Environmental Radioactivity. 102, 1039-1044.
Smith, S.M., Pierson, D.L., Mehta, S.K., Zwart, S.R., 2010. Intake of fish and omega-3 (n-3) fatty acids: effect on bone during actual and simulated weightlessness. Faseb Journal. 24.
Söderasp, J., Pettersson, M., 2019. Before and After the Weser Case: Legal Application of the Water Framework Directive Environmental Objectives in Sweden. Journal of Environmental Law. 31, 265-290.
Sørensen, M., Gong, Y., Bjarnason, F., Vasanth, G.K., Dahle, D., Huntley, M., Kiron, V., 2017. Nannochloropsis oceania-derived defatted meal as an alternative to fishmeal in Atlantic salmon feeds. PLOS ONE. 12, e0179907.
Soto, D., Jara, F., Moreno, C., 2001. Escaped salmon in the inner seas, southern Chile: Facing ecological and social conflicts. Ecological Applications. 11, 1750-1762.
Soyano, K., Mushirobira, Y., 2018. The Mechanism of Low-Temperature Tolerance in Fish. in: IwayaInoue, M., Sakurai, M., Uemura, M. (Eds.), Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation: Adaptation Mechanisms and Their Applications, pp. 149-164.
Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering. 101, 87-96.
Stein, T.P., Blanc, S., 2011. Does Protein Supplementation Prevent Muscle Disuse Atrophy and Loss of Strength? Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 51, 828-834.

Strauch, S.M., Wenzel, L.C., Bischoff, A., Dellwig, O., Klein, J., Schüch, A., Wasenitz, B., Palm, H.W., 2018. Commercial African Catfish (Clarias gariepinus) Recirculating Aquaculture Systems: Assessment of Element and Energy Pathways with Special Focus on the Phosphorus Cycle. Sustainability. 10, 1805.

Sutherland, D.L., Montemezzani, V., Mehrabadi, A., Craggs, R.J., 2016. Winter-time CO2 addition in high rate algal mesocosms for enhanced microalgal performance. Water Research. 89, 301-308.

Sutherland, D.L., Howard-Williams, C., Turnbull, M.H., Broady, P.A., Craggs, R.J., 2015. The effects of CO2 addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal. Water Research. 70, 9-26.

Tacon, A.G.J., Metian, M., 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. Aquaculture. 285, 146-158.

Tacon, A.G.J., Lemos, D., Metian, M., 2020. Fish for Health: Improved Nutritional Quality of Cultured Fish for Human Consumption. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture. 28, 449-458.

Thomas, P.K., Dunn, G.P., Good, A.R., Callahan, M.P., Coats, E.R., Newby, D.T., Feris, K.P., 2019. A natural algal polyculture outperforms an assembled polyculture in wastewater-based open pond biofuel production. Algal Research. 40, 101488.

Thompson, K.R., Rawles, S.D., Metts, L.S., Smith, R., Wimsatt, A., Gannam, A.L., Twibell, R.G., Johnson, R.B., Brady, Y.J., Webster, C.D., 2008. Digestibility of dry matter, protein, lipid, and organic matter of two fish meals, two poultry by-product meals, soybean meal, and distiller's dried grains with solubles in practical diets for sunshine bass, Morone chrysops x M-Saxatilis. Journal of the World Aquaculture Society. 39, 352-363.

Tibaldi, E., Hakim, Y., Uni, Z., Tulli, F., de Francesco, M., Luzzana, U., Harpaz, S., 2006. Effects of the partial substitution of dietary fish meal by differently processed soybean meals on growth performance, nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in the European sea bass (Dicentrarchus labrax). Aquaculture. 261, 182-193.

Tibaldi, E., Zittelli, G.C., Parisi, G., Bruno, M., Giorgi, G., Tulli, F., Venturini, S., Tredici, M.R., Poli, B.M., 2015. Growth performance and quality traits of European sea bass (D. labrax) fed diets including increasing levels of freeze-dried Isochrysis sp (T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. Aquaculture. 440, 60-68.

Tocher, D.R., 2015. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. Aquaculture. 449, 94-107.

Tran, G., Heuzé, V., Makkar, H.P.S., 2015. Insects in fish diets. Animal Frontiers. 5, 37-44.

Troell, M., Joyce, A., Chopin, T., Neori, A., Buschmann, A.H., Fang, J.G., 2009. Ecological engineering in aquaculture - Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. Aquaculture. 297, 1-9.

Trout, O.F., Jr., Bruchey, W.J., Jr., 1969. Water immersion reduced-gravity simulation. Hum Factors. 11, 473-487.

Tsalafouta, A., Papandroulakis, N., Gorissen, M., Katharios, P., Flik, G., Pavlidis, M., 2014. Ontogenesis of the HPI axis and molecular regulation of the cortisol stress response during early development in Dicentrarchus labrax. Scientific Reports. 4.

Tulli, F., Zittelli, G.C., Giorgi, G., Poli, B.M., Tibaldi, E., Tredici, M.R., 2012. Effect of the Inclusion of Dried Tetraselmis suecica on Growth, Feed Utilization, and Fillet Composition of European Sea Bass Juveniles Fed Organic Diets. Journal of Aquatic Food Product Technology. 21, 188-197.

Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G., 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. Veterinarni Medicina. 56, 486-503.

Valente, L.M.P., Custódio, M., Batista, S., Fernandes, H., Kiron, V., 2019. Defatted microalgae (Nannochloropsis sp.) from biorefinery as a potential feed protein source to replace fishmeal in European sea bass diets. Fish Physiol Biochem. 45, 1067-1081.

Vallejos-Vidal, E., Sanz-Milián, B., Teles, M., Reyes-Cerpa, S., Mancera, J.M., Tort, L., Reyes-López, F.E., 2022. The gene expression profile of the glucocorticoid receptor 1 (gr1) but not gr2 is modulated in mucosal tissues of gilthead sea bream (Sparus aurata) exposed to acute air-exposure stress. Frontiers in Marine Science. 9.

Vasseur, C., Bougaran, G., Garnier, M., Hamelin, J., Leboulanger, C., Le Chevanton, M., Mostajir, B., Sialve, B., Steyer, J.P., Fouilland, E., 2012. Carbon conversion efficiency and population dynamics of a marine algae-bacteria consortium growing on simplified synthetic digestate: First step in a bioprocess coupling algal production and anaerobic digestion. Bioresource Technology. 119, 79-87.

Vaz, M., Pires, D., Pires, P., Simões, M., Pombo, A., Santos, P., do Carmo, B., Passos, R., Costa, J.Z., Thompson, K.D., Baptista, T., 2022. Early Immune Modulation in European Seabass (Dicentrarchus labrax) Juveniles in Response to Betanodavirus Infection. Fishes. 7, 63.

Vizcaino, A.J., Lopez, G., Saez, M.I., Jimenez, J.A., Barros, A., Hidalgo, L., Camacho-Rodriguez, J., Martinez, T.F., Ceron-Garcia, M.C., Alarcon, F.J., 2014. Effects of the microalga Scenedesmus almeriensis as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, Sparus aurata, juveniles. Aquaculture. 431, 34-43.

Vizcaíno, A.J., Saéz, M.I., López, G., Arizcun, M., Abellán, E., Martínez, T.F., Cerón-García, M.C., Alarcón, F.J., 2016. Tetraselmis suecia and Tisochrysis lutea meal as dietary ingredients for gilthead sea bream (Sparus aurata L.) fry. Journal of Applied Phycology.

Vizcaíno, A.J., Rodiles, A., López, G., Sáez, M.I., Herrera, M., Hachero, I., Martínez, T.F., Cerón-García, M.C., Alarcón, F.J., 2018. Growth performance, body composition, and digestive functionality of Senegalese sole (Solea senegalensis Kaup, 1858) juveniles fed diets including microalgae freeze-dried biomass. Fish Physiol Biochem. 44, 661-677.

von Baumgarten, R.J., Simmonds, R.C., Boyd, J.F., Garriott, O.K., 1975. Effects of prolonged weightlessness on the swimming pattern of fish aboard Skylab 3. Aviat Space Environ Med. 46, 902-906.

von Holst, C., Boix, A., Baeten, V., Vancutsem, J., Berben, G., 2006. Determination of processed animal proteins in feed: The performance characteristics of classical microscopy and immunoassay methods. Food Additives and Contaminants. 23, 252-264.

Vuolo, M., Baiocco, G., Barbieri, S., Bocchini, L., Giraudo, M., Gheysens, T., Lobascio, C., Ottolenghi, A., 2017. Exploring innovative radiation shielding approaches in space: A material and design study for a wearable radiation protection spacesuit. Life Sciences in Space Research. 15, 69-78.

Walker, A.B., Berlinsky, D.L., 2011. Effects of Partial Replacement of Fish Meal Protein by Microalgae on Growth, Feed Intake, and Body Composition of Atlantic Cod. North American Journal of Aquaculture. 73, 76-83.

Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C., 2008. CO2 bio-mitigation using microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology. 79, 707-718.

Wang, H.Q., Hagemann, A., Reitan, K.I., Ejlertsson, J., Wollan, H., Handa, A., Malzahn, A.M., 2019. Potential of the polychaete Hediste diversicolor fed on aquaculture and biogas side streams as an aquaculture food source. Aquaculture Environment Interactions. 11, 551-562.

Weidner, T., Yang, A., 2020. The potential of urban agriculture in combination with organic waste valorization: Assessment of resource flows and emissions for two european cities. Journal of Cleaner Production. 244, 118490.

Wiederhold, M.L., Harrison, J.L., Gao, W.Y., 2003. A critical period for gravitational effects on otolith formation. Journal of Vestibular Research-Equilibrium & Orientation. 13, 205-214.

Yang, A.D., 2011. Modeling and Evaluation of CO2 Supply and Utilization in Algal Ponds. Industrial & Engineering Chemistry Research. 50, 11181-11192.

Yang, L., Wang, R., Lu, Q., Liu, H., 2019a. “Algaquaculture” integrating algae-culture with aquaculture for sustainable development. Journal of Cleaner Production. 244, 118765.

Yang, L.M., Li, H.K., Liu, T.G., Zhong, Y.Q., Ji, C.C., Lu, Q., Fan, L.L., Li, J., Leng, L.J., Li, K., Zhou, W.G., 2019b. Microalgae biotechnology as an attempt for bioregenerative life support systems: problems and prospects. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 94, 3039-3048.
Yang, Q., Wang, X., Shi, X., Li, K., Yue, L., 2012. Study On Biological Fixation Of High-Concentration CO2 Using Chlorella Pyrenoidosa. in: Wang, D. (Ed.), Materials for Environmental Protection and Energy Application, Pts 1 and 2, pp. 361-367.
Yano, T., Hatayama, Y., Matsuyama, H., Nakao, M., 1988. Titration of the alternative complement patway activity of representative cultured fishes. Nippon Suisan Gakkaishi. 54, 1049-1054.
Yun, Y.S., Lee, S.B., Park, J.M., Lee, C.I., Yang, J.W., 1997. Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 69, 451-455.
Zabel, P., Bamsey, M., Schubert, D., Tajmar, M., 2016. Review and analysis of over 40 years of space plant growth systems. Life Sciences in Space Research. 10, 1-16.
Zeidler, C., Vrakking, V., Bamsey, M., Poulet, L., Zabel, P., Schubert, D., Paille, C., Mazzoleni, E., Domurath, N., 2017. Greenhouse Module for Space System: A Lunar Greenhouse Design. Open Agriculture. 2, 116-132.
Zeng, X.H., Danquah, M.K., Chen, X.D., Lu, Y.H., 2011. Microalgae bioengineering: From CO2 fixation to biofuel production. Renewable & Sustainable Energy Reviews. 15, 3252-3260.
Zhang, Y., Zhang, Y.-k., Li, Z., 2022. A new and improved aquaponics system model for food production patterns for urban architecture. Journal of Cleaner Production. 342, 130867.
Zimmerman, R., 2003. Leaving Earth: Space Stations, Rival Superpowers, and the Quest for Interplanetary Travel. National Academies Press.
Zwart, S.R., Pierson, D., Mehta, S., Gonda, S., Smith, S.M., 2010. Capacity of Omega-3 Fatty Acids or Eicosapentaenoic Acid to Counteract Weightlessness-Induced Bone Loss by Inhibiting NF-kappa B Activation: From Cells to Bed Rest to Astronauts. Journal of Bone and Mineral Research. 25, 1049-1057.

9 ANNEXES

Journal of CO_2 Utilization 38 (2020) 187–193

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of CO_2 Utilization

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcou

Control of the pH for marine microalgae polycultures: A key point for CO_2 fixation improvement in intensive cultures

Amandine Galès[a,b], Sébastien Triplet[c], Thibault Geoffroy[c], Cécile Roques[a], Claire Carré[a], Emilie Le Floc'h[a], Mélissa Lanfranchi[a,c], Monique Simier[a], Emmanuelle Roque d'Orbcastel[a], Cyrille Przybyla[a], Eric Fouilland[a,*]

[a] MARBEC, Univ Montpellier, IRD, CNRS, IFREMER, Montpellier, Sète & Palavas, France
[b] LBE, Univ Montpellier, INRA, Narbonne, France
[c] IFREMER L-SEA, Palavas, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Carbon yield
Microalgal diversity
pH
Predators

ABSTRACT

Recently, CO_2 recycling for the production of valuable microalgae has acquired substantial interest. Most studies investigating CO_2 conversion efficiency in algal cultures were based on single species, although a stabilising effect of algal diversity on biomass production was recently highlighted. However, addition of CO_2 into polyalgal cultures requires a careful control of pH; performance of CO_2 conversion, growth and carbon biomass production are affected by pH differently, depending on the species of microalgae. This study investigates the efficiency of CO_2 conversion by natural marine algal assemblage cultivated in open, land-based raceways (4.5 m^3, 10 m^2), working as high rate algal ponds (HRAP). Ponds were enriched with nitrogen and phosphate, pure CO_2 was added and algal cultures were grown under three different fixed pH levels: pH 6, 7 and 8. The highest conversion of photosynthetically fixed CO_2 into carbon biomass (40 %) was reached at pH 7, an intermediate level, due to the partial CO_2 asphyxiation of algal predators (copepods, ciliates), while being under the suboptimal conditions for the development of marine amoebae. Under this pH, the theoretical maximal biological conversion of available CO_2 into carbon biomass was estimated to be 60 % in naturally inoculated open ponds.

1. Introduction

Algae has become a focal point in the circular economy to valorise industrial waste in order to continually use resources and reduce industrial CO_2 emissions to the atmosphere [1,2]. Through photosynthesis, microalgae can convert CO_2 from industrial flue gas into biomass that can potentially be used for the production of biofuel, biochemical products or green chemistry [3–5]. Industrial flue gas contains potentially toxic contaminants which can lead to reductions in the production of biomass [6]. Additionally, injection of CO_2 acidifies algal culture medium by modifying the balance of carbonates in the water [7]. This acidification could counterbalance CO_2 fixation by microalgae which alkalinises their growth environment [7]. A controlled injection of CO_2 would maintain an optimal pH level that could be adjusted to optimise for metabolic activity of algal species [7]. For example, the marine microalgae *Nannochloris* sp. achieves maximal growth rate at pH 6, maximum carbon content at pH 7 and maximal carbon conversion efficiency at pH 8 [8]. Other example, the optimal gowth of the cyanobacteria *Spirulina platensis* and the green algae *Chlorococcum littorale* are at pH 9 and 4, respectively [9]. In microalgal predators, lower pH (associated with CO_2 injection) negatively affects the densities and grazing activity of rotifers [10–12]. If we ignore the potential effects of associated contaminants, using CO_2 from industrial flue gas can combine pH control during high photosynthetic CO_2 fixation and reduction of algal grazing pressure.

Large-scale industrial cultivation of marine microalgae appears to be one of the most promising approaches of sustainable sources of food (lipids and proteins) and energy [13]. Narwani et al. [14] demonstrated stabilising effects of biodiversity on biocrude production from polycultures of several assembled algal species using raceway ponds under variable environmental conditions. However, higher performance can be reached using natural algal polyculture than assembled polyculture [15].

We suggest that an optimal pH can be reached for maximising carbon conversion efficiency of a natural marine polyculture of microalgae while reducing grazers development. Natural marine

* Corresponding author.
E-mail address: eric.fouilland@cnrs.fr (E. Fouilland).

https://doi.org/10.1016/j.jcou.2020.01.019
Received 3 September 2019; Received in revised form 16 December 2019; Accepted 21 January 2020
2212-9820/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

polycultures were cultivated in High Rate Algal Ponds (HRAP) in a Mediterranean climate with different levels of pure CO_2. We measured algal diversity, photosynthetic CO_2 uptake, carbon biomass accumulation, and associated development of algal predators under three different pH values. We developed performance curves of biological CO_2 conversion efficiency as function of pH. Results from this study provide a comprehensive assessment of the biological CO_2 conversion efficiency from marine microalgae cultivated in open ponds. The results from this experiment can inform engineering projects for industrial CO_2 sequestration or mass production of marine microalgae.

2. Material & methods

2.1. Experimental design

An intensive culture of natural microalgae from Mediterranean seawater was performed outdoors in high rate algal ponds (HRAP) as described in Metaxa et al. [16]. HRAPs are oval-shaped ponds (6 m long, 2 m wide and 0.6 m deep) with a working volume of 4.46 m^3 and surface area of 10 m^2. Water mixing in the HRAPs was maintained at 0.2 m s^{-1} using a vacuum airlift column developed and patented by COLDEP® [17]. Briefly, the column was connected to the HRAP and was composed of a central tube, the top of which was hermetically closed and connected to a vacuum pump. Water was raised to top of the central tube with a vacuum and was allowed to flow over the central tube so that it could be returned to the HRAP. We maintained pH using an automatic JBL pH-controller system (JBL ProFlora m1003) connected to a pure CO_2 bottle using a solenoid valve. We diffused CO_2 through a ceramic gas diffuser in the HRAP. The JBL ProFlora system used a combined Ag/AgCl KCl-electrolyte pH electrode at operational IUPAC scale calibrated monthly using commercial NIST buffers with precision of 0.05 pH units with an additional systematic error of about 0.15 pH units relative to seawater scale [18].

Experiments were conducted at the Ifremer Station of Palavas-les-Flots, Hérault, France during spring and early summer 2016 to coincide with the climatic period of favourable algal growth. The first run of experiment (run 1) occurred from 17 May to 22 June 2016 (36 days); run 2 occurred from 27 June to 26 July 2016 (29 days). For each experimental run, three HRAPs were monitored simultaneously on batch feeding mode and maintained at pH of 6, 7 and 8, respectively. We assessed cumulated photosynthetic CO_2 fixation, production of carbon biomass, microalgal diversity and predator identification.

For all experiments, seawater was pumped from the Mediterranean Sea, inoculated using non-specific microalgae inoculant and filtered through a 100 µm sand filter before entering HRAPs. All HRAPs were supplemented with phosphorus to have final concentrations of 5 mg L^{-1} of phosphate and nitrogen to achieve 80 mg L^{-1} of nitrate and ammonium.

2.2. Physical and chemical variables

2.2.1. Meteorological variables

Global, direct and diffuse solar radiation were recorded every hour at the Météo-France station at Fréjorgues airport, 7 km from the experimental site.

2.2.2. Water pH, salinity, light and temperature measurements

Water temperature (accuracy of 0.5 °C) in HRAPs were recorded every 10 min and salinity (accuracy of 0.1 PSU) in HRAPs was recorded once a day using a PONSEL ODEON X meter. In addition to JBL ProFlora system, water pH was measured every 10 min in one point of the well-mixed HRAPs (water circulation of 0.2 m.s^{-1}) using a combined Ag/AgCl KCl electrolyte ODEON electrode with a resolution of 0.01 pH units and an accuracy of 0.1 pH units. The underwater light intensity in HRAPs was recorded every 15 min at three depths (subsurface, 20 and 40 cm) using waterproof light data loggers (UA-002-64 HOBO, Onset).

2.3. Biological variables

2.3.1. Microalgae biomass and diversity

The algal biomass was assessed daily when possible for Chlorophyll *a* (Chl*a*) and weekly for particulate organic carbon (POC) measurements. For Chl*a* measurements, between 3 and 800 ml samples (depending on sample loading) were filtered onto 13 mm GF/F fibreglassfibre filters to determine the total Chl*a* concentrations. For size-fractionated Chl*a* measurements, between 50 and 800 ml samples were filtered using 20 µm, 5 µm and 2 µm membrane filters and GF/F fibreglass (0.7 µm nominal pore size). Filters were stored frozen at −20 °C until extraction with 5 ml of 100 % ethanol. Extractions were performed after ultrasonication in an ice bath followed by overnight extraction at 4 °C. Samples were then filtered and extract absorbance was measured at 632, 649 and 665 nm (with absorbance at 750 nm used for a baseline correction) using a Shimadzu UV1800 zeroed with 100 % ethanol. Chlorophyll concentration was calculated according to Ritchie [19]. For the POC measurements, between 5 and 100 mL samples were filtered onto precombusted Whatman GF/F filters and stored at −80 °C for analysis. The filters were then dried at 60 °C for 24 h, pelleted and analysed using an ANCA mass spectrometer (Europa Scientific). Because of the small volume of samples (< 100 ml), we assumed that microalgae were mainly collected and retained onto the filters (nominal pore size of 0.7 µm) and the POC measurement was therefore representative of microalgae carbon biomass. This is supported by positive linear correlation between Chl*a* and POC measurements ($r^2 = 0.85, p < 0.001$, n = 33) leading to a Chla:POC ratio of 55, similar to the value measured for marine green algae and Prymnesiophyceae in the Mediterranean Sea [20].

Microalgal community structure was determined in all HRAPs at the beginning (Day 0) and at the end of each experimental run (Day 36 and Day 29) using 18S rRNA gene analysis. For each experimental run, 10 mL samples were filtered onto 0.2 µm membranes (PALL ALL Supor® 200 PES) and stored at −20 °C for subsequent DNA extractions. The DNA was extracted using DNeasy PowerWater Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The V4 region of the 18S rRNA gene was amplified over 30 amplification cycles at an annealing temperature of 65 °C, with forward and reverse primers (5′-CTTTCCCTAACGACGC TCTTCCGATCTGCGGTAATTCCAGCTCCAA-3′ and 5′-GGAGTTCAGAC GTGTGCTCTTCCGATCTTTGGCAAATGCTTTCGC-3′, respectively) with their associated linkers. The resulting products were purified and loaded onto an Illumina MiSeq cartridge for sequencing, paired with 300 bp reads following manufacturer's instructions (v3 chemistry). Sequencing and library preparation steps were carried out at the Genotoul Lifescience Network Genome and Transcriptome Core Facility in Toulouse, France (get.genotoul.fr). A modified version of the standard operation procedure for MiSeq data [21] in Mothur version 1.35.0 [22] was used for alignment and taxonomic outline. Mothur was also used to identify representative sequences of operational taxonomic units (OTUs).

2.3.2. Algal predator diversity

To characterise the presence and abundance of protozoan and metazoan organisms, 2 L water samples were filtered sequentially through a 100 µm and 35 µm filters to separate 35–100 µm and > 100 µm size fractions, which were then stored in neutralised formalin (4 % final concentration). Protozoan and metazoan taxa from a subsample of the 35–100 µm fraction were identified, sized and enumerated using an Olympus AX70 dissecting microscope with a Nageotte counting chamber. Protozoan and metazoan taxa from a subsample of the > 100 µm fraction were identified and enumerated using an Olympus Stereomicroscope SZX7 with a Bogorov counting chamber.

2.3.3. HRAP photosynthetic CO_2 uptake

The photosynthetic CO_2 uptake by microalgae in HRAPs was computed from the relationship between biomass-specific gross photosynthetic oxygen production and the light intensity (photosynthesis-irradiance P-I model). The weekly photosynthetic oxygen production was measured at the laboratory as detailed below. Algal biomass (Chl*a*) was measured every day when possible in the HRAPs. Average light intensity received by microalgae was measured every 15 min at mid-depth (0.2 m) in each HRAP.

Samples were collected weekly from HRAPs, distributed to air-tight 30 mL polycarbonate flasks and placed in a custom-made, controlled-temperature photosynthetron with a light density gradient up to 400 µmol photons $m^{-2}s^{-1}$ using an array of 4 W white LEDs. Photosynthetically active radiation (PAR) was measured using a US-SQS/L spherical quantum microprobe (Walz, Effeltrich, Germany). The temperature was kept constant within the HRAPs by heating or cooling. Dissolved oxygen (to determine net photosynthesis) was measured using a FireSting optode system (Pyro-Science, Aachen, Germany) every 20 min for 6 h of incubation in all illuminated flasks. Net photosynthetic rate was calculated at all light intensities. Samples were also incubated in the dark at the same temperature to determine respiration rate (oxygen consumption). Gross photosynthetic rates for all light intensities were calculated as the sum of net photosynthetic rates and respiration rates. Gross photosynthetic rates were expressed in carbon units using a photosynthetic quotient of 1 [23] and in algal biomass units using Chlorophyll *a* measurements. These were plotted against irradiance using the P-I model described by Eilers and Peters [24] using the phytotools R package (https://cran.r-project.org/package=phytotools). The instantaneous gross photosynthetic CO_2 uptake rates were derived from the P-I model obtained every week for each HRAP, the Chl*a* biomass measurement measured every day and the light measurements taken every 15 min at mid-depth during P-I model assessment. For the calculation of instantaneous photosynthetic rates, we assumed there was no significant change of P-I parameter values during a week and the Chl*a* biomass during a day.

The total gross photosynthetic CO_2 uptake for HRAPs was calculated as the sum of all instantaneous gross CO_2 uptake rates obtained during the whole experiment in each HRAP.

2.3.4. Prediction of minimal CO_2 losses

We attempted to predict the minimal carbon losses through biological activity (respiration, exudation, predation) using a generalised additive model (GAM) in R [25] with the mgcv package [26]. Carbon lost through biological activity was calculated as the fraction of gross photosynthetically fixed CO_2 not accumulated into the C biomass over time series from HRAPs at pH 7.

3. Results & discussion

3.1. Influence of pH on algal diversity and predation

In the pH-6 HRAPs, pH averaged 6.2 ± 0.2 (Figure S1). Lower pH variability was observed in the pH-7 HRAPs (Figure S1), where pH averaged 6.7 ± 0.1 and 7.0 ± 0.1 during run 1 and run 2, respectively. In the pH-8 HRAPs, pH averaged 8.2 ± 0.1 and 7.9 ± 0.1 during run 1 and run 2, respectively. When pooling pH measured during both experimental runs, pH averaged 6.2 ± 0.2, 6.9 ± 0.2, and 8.1 ± 0.2 in HRAPs with pH targeted at 6, 7 and 8 respectively. The addition of CO_2 acidifies seawaters and impacts the growth of marine planktonic organisms found in naturally buffered seawater at pH 8.07 in the Mediterranean Sea [27]. The growth of larger microalgae (> 5 µm, Fig. 1), such as *Chlamydomonas* sp., was favoured at pH 6, while smaller microalgae (< 2 µm, Fig. 1), such as *Nannochloris* sp. and *Chlorella stigmatophora,* attained maximal growth rates at pH 7 and 8, respectively (Fig. 2). The latter two species have been reported to be highly resilient to environmental variability, rapidly growing, and living in marine polluted waters [28–30]. Of economic interests for industries, *Nannochloris*-like species [31] show a high potential for removing nitrogen and phosphorus from nutrient-polluted waters whilst maintaining a stable biochemical profile under environmental changes [32]. Our results suggest that adding CO_2 to control pH is a viable tool for favouring the development of one specific microalgal species among a natural assemblage.

Although differences in microalgal diversity were observed in HRAPs, no significant differences were found among pH treatments for the photosynthetic parameters, Pmax and Ik (Table S1). However, photoinhibitory effect was significantly higher in HRAPs at pH 7 and 8 than in HRAPs at pH 6 (ANOVA $p < 0.05$, Tukey post hoc; Table S1). As expected, microalgae in all HRAPs were acclimated to higher Ik values and lower w values in July than in June during the experiments (ANOVA $p < 0.05$, Tukey post hoc; Suppl. Table S1).

Interestingly, rhizopod development in amoebae was observed in HRAPs at pH 6 (Table 1). Rhizopod amoebae are known to feed on organic matter, bacteria, and small algal cells [33,34]; they also have higher growth rates at pH lower than seawater [35]. The rapid development of amoebae would prevent the abundance of small algal cells observed under the other pH conditions. In contrast, ciliates (both attached and free) grew rapidly at pH 8 and dominated the community of predators in HRAPs. Copepods (adults and nauplii) were also observed in HRAPs at pH 7 and 8 but were not observed at pH 6. The pH, therefore, seems to have a direct impact on the presence of predators of algae. Low pH has a negative effect on ciliates and copepods but a positive effect on the presence of amoebae. As a consequence, low levels of microalgal accumulation were observed at pH 6. The development of the typical marine trophic food web (ciliates, copepods) was observed in the HRAP at pH 8, leading to the dominance of very small algal cells. At intermediate pH of 7, the abundance of predators was the lowest (Table 1) and the accumulation of microalgal biomass was affected by the initial community structure of predators and temperature. Indeed, a lower level of algal biomass accumulation was observed in the HRAP at pH 7 during run 2 (Fig. 3) when the initial presence of rhizopod amoebae (Table 1) and water temperature (average level was > 25 °C) was significantly higher ($p < 0.05$, which was determined using a t-test).

Injection of CO_2 into HRAPs negatively affects zooplankton (Cladoceans, copepods, rotifers) through asphyxiation, allowing an increase in algal productivity and biomass [10,11]. Similarly, in this study, no copepods grew in HRAPs where a continuous injection of CO_2 was done in order to maintain a pH of 6. In addition, the final abundance protozoans and metazoans > 100 µm decreased as injected CO_2 accumulated (lower pH) in the HRAPs (Table 1). This highlights the difficulty that large-sized aquatic organisms had maintaining a costly mode of respiration in media where CO_2 replaced O_2 availability. In contrast, the reductions in pH through the CO_2 injection favoured the development of rhizopods (mainly amoebae) that strongly limited algal biomass accumulation in the HRAPs. This is the first report of this observation in the literature, and it may have dramatic consequences on marine microalgae cultures in large-scale facilities.

3.2. Influence of pH on algal biomass accumulation

In this study, the highest accumulation of carbon as algal biomass (> 150 mg L^{-1}) was observed in HRAPs at pH 8 and the lowest values (< 50 mg L^{-1}) were observed in HRAPs at pH 6 (Fig. 3). Interestingly, algal biomass in HRAPs at the intermediate pH 7 had more variability and was influenced by seasonality, greater for run 1 than run 2 (Fig. 3). In all HRAPs, lower algal biomass was observed during run 2. Initial algal diversity was different between runs with abundance of *Nannochloris* sp. observed in June relatively to July. Water temperature was higher in July (average of 25.3 °C) than in June (average of 21.8 °C) and influenced predator development (Table 1), leading to higher predatory pressure on microalgae.

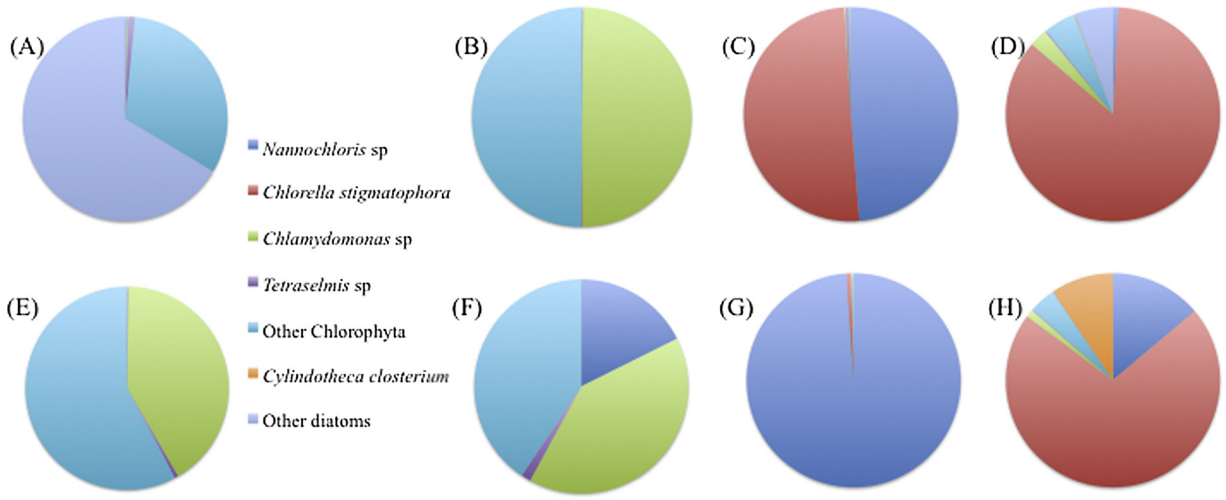


Fig. 1. The diversity of microalgae was determined using 18S rRNA gene analysis. The first experiment ran from 17 May to 22 June 2016 (A–D). Organisms identified in the beginning of the experiment (A) and those identified at the end of the experiment in HRAPs at pH 6 (B), pH 7 (C) and pH 8 (D). The second experiment ran from 27 June 27 to 26 July 2016 (E–H). Organisms identified at the beginning of the experiment (E) and at the end of the experiment in HRAPs at pH 6 (F), pH 7 (G) and pH 8 (H).

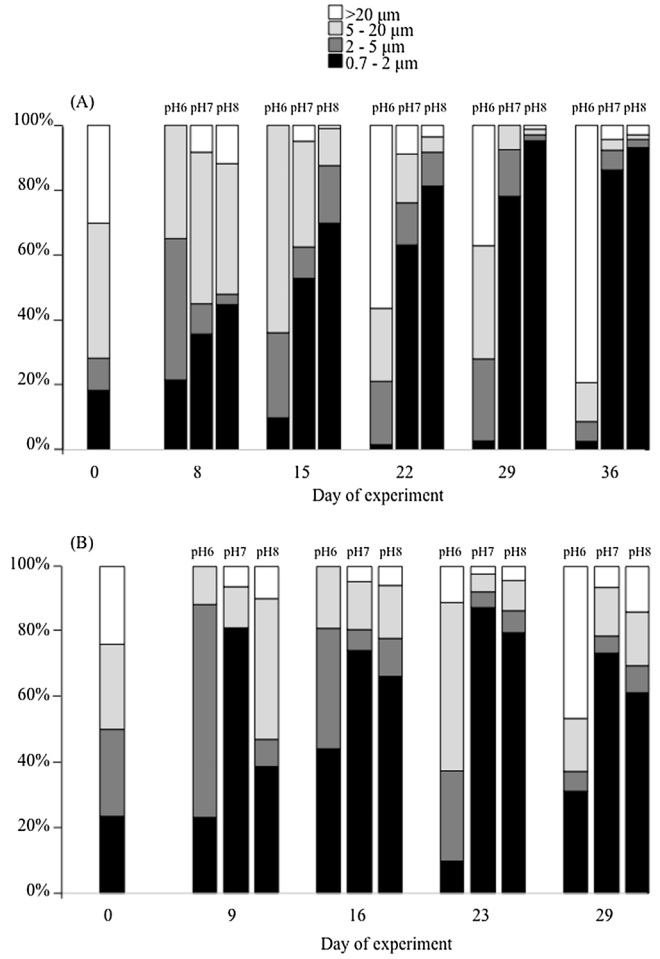


Fig. 2. Size fractions of algal biomass (Chl*a* measurements) measured in HRAPs at pH 6, 7 and 8 during the first experimental run 1 (A) and the second experimental run 2 (B).

The loss of carbon that was photosynthetically fixed but not ultimately accumulated into algal carbon biomass was estimated from the difference between the total photosynthetic CO_2 uptake and the algal carbon biomass accumulated over time (Table 2). When differences were larger, algal biomass lost greater amounts of carbon through algal CO_2 respiration, algal carbon exudation and algal mortality by predation or viral lysis. In all HRAPs, carbon loss increased rapidly over time, reaching more than 90 % of the gross photosynthetic CO_2 uptake measured throughout the experimental period (Table 2). Most CO_2 loss is related to high microalgal respiration rate which has been reported to be 60–90 % of the photosynthetic fixed CO_2 [36]. Carbon loss through respiration is combined with the carbon loss through algal exudation and predation increasing with substrate limitation and time, respectively. Interestingly, the lowest carbon loss (60 and 68 %) was observed within the first week of the experiments at pH 7 (Table 2). This supports our observations that intermediate pH reduces grazing on marine microalgal growth as a result of partial asphyxiation of ciliates and copepods, but maintains optimal conditions for development of amoebae that prefer more acidic waters.

3.3. Predictions of maximal biological CO_2 conversion efficiency in HRAP

We predicted the theoretical level of minimal carbon loss through biological activity (respiration, exudation, predation) using a GAM model with a smooth function of time and four degrees of freedom. Biological activity explained 77 % of deviance ($R^2 = 0.64$) for biological carbon loss. Using this model, a new time series and confidence interval were predicted for time points that varied from 0 to 44 days using a step of 1 day (Fig. 4). The minimal fraction of gross photosynthetically fixed CO_2 that was not accumulated into biomass was predicted using the value reached at day 0 (Fig. 4). This fraction (44 ± 25 %) is considered as the combination of i) the minimal loss of carbon due to CO_2 respiration required for algal metabolism (typically 20–30 % of the maximal algal growth rate; [37]) and ii) the algal carbon exudation (7–50 % of total photosynthetically fixed CO_2; [38]). Therefore, the maximal theoretical CO_2 utilisation efficiency would be 56 % (= 100 %–44 %), corresponding to lowest biological CO_2 loss (in an open raceway using natural marine inoculate. The maximal CO_2 utilisation efficiency reported during this study (40 %) was measured one week after the beginning of the experiment. This value corresponds to values determined for CO_2 utilisation efficiency (31–49 %) reported for *Nannochloris* sp. cultivated in batch mode indoors in a 10 m^2 raceway at pH 7.5 for 14 days [39]. Similarly, the highest CO_2 utilisation efficiency observed by Asadollahzadeh et al. [39] occurred one week after the beginning of the experiment when algal productivity was at its highest level. From our results, we show a positive correlation between

Table 1
Abundance of all the main groups of protozoans and metazoans identified by microscopy in the HRAP at pH 6, 7 and 8 at the beginning and at the end of two experimental runs of the study.

Size fraction	Group (ind. L^{-1})	20th of May 2016 (D0)	22rd of June 2016 (D36)			28th of June 2016 (D0)	26th of July 2016 (D29)		
			pH 6	pH 7	pH 8		pH 6	pH 7	pH 8
35-100 µm	Free ciliates		208	312	3952	103	3328	1664	34320
	Attached ciliates	52	3432	832	120016			1040	43888
	Rhizopods		18408	624	1040	11	57928	8008	1352
	Actinopods				416		1976	416	208
	Nematods	10	520	936	416		104	2184	
	Rotifers								520
	Copepods			1664	104			312	2600
> 100 µm	Nematods larvae	9	104		351	5	50	513	169
	Tisbe sp.			299	156				871
	Tisbe nauplius	0							104
	Copepod nauplii			59					

water resident time and loss of fixed CO_2 through biological activity, especially through predation. We suggest that microalgal cultivation time should be sufficiently short to avoid the substantial development of predators while maintaining high algal productivity. The present experiment was run under batch culture mode where microorganisms are inoculated to a fixed volume of medium and they gradually consumed nutrients until exhaustion. A continuous culture mode seems more adapted than batch culture mode, because fresh medium is continuously added to the culture while used medium and cells are harvested at the same time. For continuous culture mode, the dilution rate (inverse of the resident time of growing cells) can be adjusted according to climatic variations for maintaining algal cells at high productivity rates and for removing slow-growth predators. Our results also show that CO_2 injection can be used for fixing pH at requested values to control the development of algal predators and to favour rapid-growth stress-tolerant microalgae species such as *Nannochloris* sp. [8,40]. This supports previous observations reported in studies with CO_2 addition in HRAPs and performed in various geographical areas (New Zealand, Southern France, Southern Spain) using natural biological inoculates [41–43]. This suggests a common response of different natural-inoculate biological communities to CO_2 injection in HRAPs. The use of artificial algal assemblages, well-adapted to CO_2 capture under low pH [44], may facilitate experimental procedures and industrialisation. However, a very recent study shows that a natural algal polyculture was more productive and stress resilient than an optimised artificially assembled polyculture when cultivated with anaerobic digester effluent and with or not grazer additions [15]. Therefore, assembled polycultures may not be as resilient as natural assemblages to cope with grazing pressure, variable growth conditions and potential contaminants when using industrial flue-gas and/or wastewater

4. Conclusion

Injection of CO_2 for microalgae production in HRAPs requires pH control. Our results show that pH 7, controlled by CO_2 addition with a variability of 0.2 pH unit, favoured the growth of *Nannochloris* sp., reduced populations of marine algal predators and photosynthetically fixed accumulated CO_2 at 40 % efficiency into carbon biomass. More acidic pH values led to the development of amoebae and restrict algal biomass accumulation. By extrapolating our experimental results, we predict that the maximal CO_2 conversion efficiency in these systems would be *ca.* 60 % of the available CO_2. Such value may be achievable if running HRAPs in a continuous mode, with a water resident time required for maintaining a rapid algal growth whilst reducing the development of algal predators. When using an industrial CO_2 source, pH regulation using injection of industrial fumes could be an effective tool for driving an algal polyculture toward more desired species. Further investigations should assess the impact of flue gas-associated contaminants on microalgal diversity, biomass production and resilience, as well as the effects of seasonal variability throughout the year on annual capability of fixing CO_2 and algal species selection using pH control in HRAPs.

CRediT authorship contribution statement

Amandine Galès: Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Sébastien Triplet:** Investigation, Formal analysis. **Thibault Geoffroy:** Investigation. **Cécile Roques:** Investigation. **Claire Carré:** Investigation. **Emilie Le Floc'h:** Investigation. **Mélissa Lanfranchi:** Investigation, Formal analysis. **Monique Simier:** Formal analysis. **Emmanuelle Roque d'Orbcastel:** Supervision. **Cyrille Przybyla:** Conceptualization, Supervision, Project administration. **Eric Fouilland:**

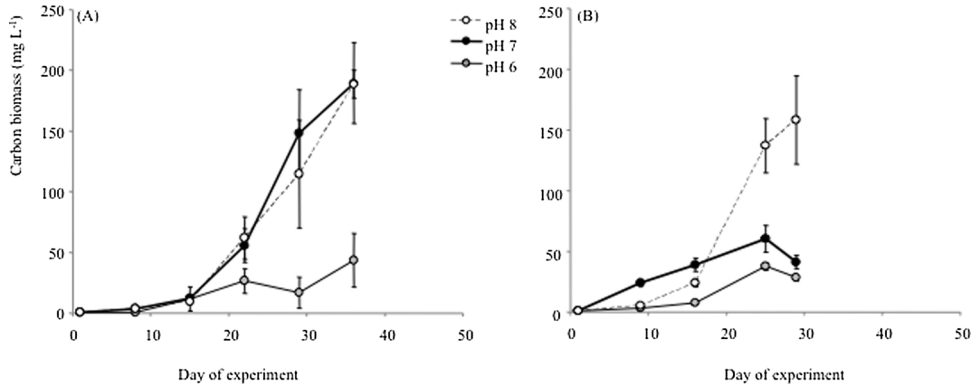


Fig. 3. Concentration of carbon biomass (POC measurements) measured in HRAPs (average and standard deviation of sample triplicates) during run 1 from 17 May to 22 June 2016 (A) and during run 2 from 27 June to 26 July 2016 (B).

Table 2
Gross photosynthetic CO_2 uptake, produced carbon biomass and carbon losses (the fraction of the gross photosynthetic CO_2 uptake that was not accumulated into carbon biomass) measured in HRAPs at pH 6, 7 and 8 during the two experimental runs.

Date	Day of experiment	pH 6			pH 7			pH 8		
		Gross photosynthetic CO_2 uptake (mgC L^{-1})	Produced C biomass (mgC L^{-1})	C loss (%)	Gross photosynthetic CO_2 uptake (mgC L^{-1})	Produced C biomass (mgC L^{-1})	C loss (%)	Gross photosynthetic CO_2 uptake (mgC L^{-1})	Produced C biomass (mgC L^{-1})	C loss (%)
20/05/16	3	0	0.0		0	0		0	0	
25/05/16	8	10	0.1	99	10	3	68	19	3	85
01/06/16	15	600	11	98	159	12	93	147	9	94
08/06/16	22	2270	26	99	767	55	93	1079	61	94
15/06/16	29	2328	16	99	1431	148	90	1985	114	94
22/06/16	36	2541	43	98	2602	189	93	3760	188	95
28/06/16	1	0	0.0		0	0		0	0	
06/07/16	9	22	2.1	91	57	23	60	15	4	73
13/07/16	16	371	6.2	98	386	38	90	203	23	89
22/07/16	25	877	36	96	875	59	93	1246	136	89
26/07/16	29	1074	27	97	1180	40	97	1620	157	90

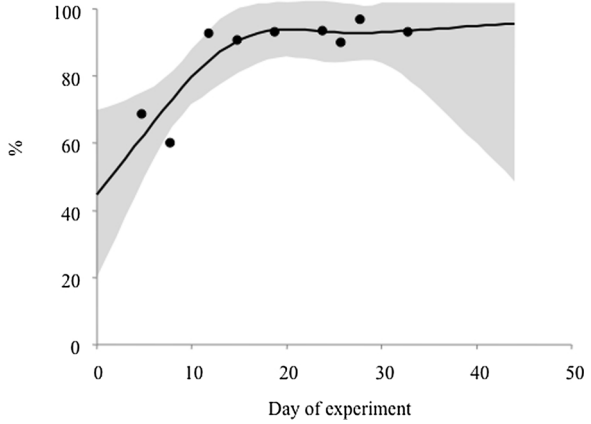


Fig. 4. The fraction (%) of gross photosynthetically fixed CO_2 that was not accumulated into the C biomass (biological losses) measured in HRAPs at pH 7 during run 1 and run 2. The time series was modelled using a generalised additive model (GAM) and was plotted (full lines) along with their confidence intervals (grey areas) at time points 0–44 days using 1-day intervals.

Conceptualization, Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

We declare that this manuscript has not any potential financial or other interests that could be perceived to influence the outcomes of the research.

Acknowledgments

This study was supported by VASCO2 project, which was funded by the Agence de l'Environnement et le la Maîtrise de l'Energie – French Environment and Energy Management Agency (ADEME). We would like to thank Patrick Raimbault (UMR MIO, Marseille) for analysing the carbon content of biomass and the two anonymous reviewers for their useful comments that improved the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.jcou.2020.01.019.

References

[1] Y.-C. Lai, C.-H. Chang, C.-Y. Chen, J.-S. Chang, I.-S. Ng, Towards protein production and application by using Chlorella species as circular economy, Bioresour. Technol. Rep. 289 (2019) 121625.
[2] W.A.V. Stiles, D. Styles, S.P. Chapman, S. Esteves, A. bywater, L. Melville, A. Silkina, I. Lupatsch, C.F. Grünewald, R. Lovitt, T. Chaloner, A. Bull, C. Morris, C.A. Llewellyn, Using microalgae in the circular economy to valorise anaerobic digestate: challenges and opportunities, Bioresour. Technol. Rep. 267 (2019) 732–742.
[3] V. Bhola, F. Swalaha, R. Ranjith Kumar, M. Singh, F. Bux, Overview of the potential microalgae for CO_2 sequestration, Int. J. Environ. Sci. Technol. 11 (2014) 2103–2118.
[4] D.E. Brune, T.J. Lundquist, J.R. Benemann, Microalgal biomass for greenhouse gas reductions: potential for replacement of fossil fuels and animal feed, J. Environ. Eng. 135 (2009) 1136–1144.
[5] B. Wang, Y. Li, N. Wu, C.Q. Lan, CO_2 bio-mitigation using microalgae, Appl. Microbiol. Biotechnol. 79 (2008) 707–718.
[6] D. Hess, K. Napan, B.T. McNeil, E.L. Torres, T. Guy, J.E. McLean, J.C. Quinn, Quantification of effects of flue gas derived inorganic contaminants on microalgae growth system and end fate of contaminants, Algal Res. 25 (2017) 68–75.
[7] R.A. Galloway, R.W. Krauss, The effect of CO2 on pH in culture media for algae, Plant Cell Physiol. 2 (1961) 331–337.
[8] C. Vasseur, G. Bougaran, M. Garnier, J. Hamelin, C. Leboulanger, M. Le Chevanton, B. Mostajir, B. Sialve, J.-P. Steyer, E. Fouilland, Carbon conversion efficiency and population dynamics of a marine algae-bacteria consortium growing on simplified synthetic digestate: first step in a bioprocess coupling algal production and anaerobic digestion, Bioresour. Technol. Rep. 119 (2012) 79–87.
[9] X. Zeng, M.K. Danquah, X.D. Chen, Y. Lu, Microalgae bioengineering: from CO_2 fixation to biofuel production, Renew. Sustain. Energy Rev. 15 (2011) 3252–3260.
[10] V. Montemezzani, I.C. Duggan, I.D. Hogg, R.J. Craggs, Screening of potential zooplankton control technologies for wastewater treatment High Rates Algal Ponds, Algal Res. 22 (2017) 1–13.
[11] V. Montemezzani, I.C. Duggan, I.D. Hogg, R.J. Craggs, Control of zooplankton populations in a wastewater treatment High Rate Algal Pond using overnight CO_2 asphyxiation, Algal Res. 26 (2017) 250–264.
[12] V. Montemezzani, I.C. Duggan, I.D. Hogg, R.J. Craggs, Assessment of potential zooplankton control treatments for wastewater treatment High Rate Algal Ponds, Algal Res. 24 (2017) 40–63.
[13] C.H. Greene, M.E. Huntley, L.N. Gerber, D.L. Sills, J. Granados, J.W. Tester, C.M. Colin, M.J. Walsh, R.R. Bidigare, S.L. Brown, W.P. Cochlan, Z.I. Johnson, X.G. Lei, S.C. Machesky, D.G. Redalje, R.E. Richarson, V. Kiron, V. Corless, Marine microalgae: climate, energy, and food security from the sea, Oceanography 29 (2016) 10–15.
[14] A. Narwani, A.R. Lashaway, D.C. Hietala, P.E. Savage, B.J. Cardinale, Power of plankton: effects of algal biodiversity on biocrude production and stability, Environ. Sci. Technol. 50 (2016) 13142–13150.
[15] P.K. Thomas, G.P. Dunn, A.R. Good, M.P. Callahan, E.R. Coats, D.T. Newby, K.P. Feris, A natural algal polyculture outperforms an assembled polyculture in wastewater-based open pond biofuel production, Algal Res. 40 (2019) 101488.
[16] E. Metaxa, G. Deviller, P. Pagand, C. Alliaume, C. Casellas, J.-P. Blancheton, High rate algal pond treatment for water reuse in a marine fish recirculation system: water purification and fish health, Aquaculture 252 (2006) 92–101.
[17] B. Barrut, J.-P. Blancheton, A. Muller-Feuga, F. René, C. Narvaez, J.-Y. Champagne, A. Grasmick, Separation efficiency of a vacuum gas lift for microalgae harvesting, Bioresour. Technol. Rep. 128 (2013) 235–240.
[18] U. Riebesell, V.J. Fabry, L. Hansson, J.P. Gattuso, Guide to Best Practices for Ocean Acidification Research and Data Reporting, Office for Official Publications of the European Communities, 2011.
[19] R.J. Ritchie, Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents, Photosynthetica 46 (2008) 115–126.
[20] M. Latasa, X.A.G. Moran, R. Scharek, M. Estrada, Estimating the carbon flux through main phytoplankton groups in the northwestern Mediterranean, Limnol.

Oceanogr. 50 (2005) 1447–1458.
[21] J.J. Kozich, S.L. Westcott, N.T. Baxter, S.K. Highlander, P.D. Schloss, Development of a dual -index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform, Appl. Environ. Microbiol. 79 (2013) 5112–5120.
[22] P.D. Schloss, S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R.A. Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, J.W. Sahl, B. Stres, G.G. Thallinger, D.J. Van Horn, C.F. Weber Schloss, Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities, Appl. Environ. Microbiol. 75 (2009) 7537–7541.
[23] P.G. Falkowski, J.A. Raven, Aquatic Photosynthesis, Blackwell Science, 1997.
[24] P.H.C. Eilers, J.C.H. Peters, A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton, Ecol. Model. 42 (1988) 199–215.
[25] R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, URL R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019https://www.R-project.org/.
[26] S.N. Wood, Generalized Additive Models: An Introduction with R, 2nd edition, Chapman and Hall/CRC, 2017.
[27] A.E.R. Hassoun, E. Gemayel, E. Krasakopoulou, C. Goyet, M.A.A. Saab, V. Guglielmi, F. Touratier, C. Falco, Acidification of the Mediterranean Sea from anthropogenic carbon penetration, Deep Sea Res. Part I: Oceanographic Research Papers 10 (2015) 1–15.
[28] R.W. Butcher, Contributions to our knowledge of the smaller marine algae, J. Mar. Biolog. Assoc. U.K. 31 (1952) 175–191.
[29] J. Fabregas, C. Herrero, J. Abalde, B. Cabezas, The marine microalga *Chlorella stigmatophora* as a potential source of single cell protein: enhancement of the protein content in response to nutrient enrichment, J. Ind. Microbiol. 1 (1986) 251–257.
[30] S.H. Cho, S.-C. Ji, S.N. Hur, J. Bae, I.-S. Park, Y._C. Song, Optimum temperature and salinity conditions for growth of green algae *Chlorella ellipsoidea* and *Nannochloris oculata*, Fish. Sci. 73 (2007) 1050–1056.
[31] W.J. Henley, J.L. Hironaka, L. Guillou, M.A. Buchheim, J.A. Buchheim, M.F. Fawley, K. Fawley, Phylogenetic analysis of the '*Nannochloris*-like' algae and diagnoses of *Picochlorum oklahomensis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), Phycologia 43 (2004) 641–652.
[32] N. von Alvensleben, K. Stookey, M. Magnusson, K. Heimann, Salinity Tolerance of *Picochlorum atomus* and the use of Salinity for contamination control by the freshwater cyanobacterium *Pseudanabaena limnetica*, PLoS One 8 (2013) e63569.
[33] L.T. Carney, T.W. Lane, Parasites in algae mass culture, Front. Microbiol. 5 (2014) 278.
[34] J. Day, Y. Gong, Q. Hu, Microzzoplanktonic grazers – a potential devasting threat to the commercial success of microalgal mass culture, Algal Res. 27 (2017) 356–365.
[35] S. Rodriguez-Zaragoza, Ecology of free-living amoebae, Crit. Rev. Microbiol. 20 (1994) 225–241.
[36] R. Herziz, P.G. Falkowski, Nitrogen limitation in *Isochryis galbana*. I. Photosynthetic energy conversion and growth efficiencies, J. Phycol. 25 (1989) 462–471.
[37] R.J. Geider, B.A. Osborne, Respiration and microalgal growth: a review of the quantitative relationship between dark respiration and growth, New Phytol. 112 (1989) 327–341.
[38] G.E. Fogg, C. Nalewajko, W.D. Watt, Extracellular products of phytoplankton photosynthesis, Proc. Royal Soc. B 162 (1965) 517–534.
[39] M.J. Asadollahzadeh, M. Ardjmand, A.A. Seafkordi, S.M. Heydarian, Efficient storage and utilization of CO_2 in open raceway ponds for cultivation of microalgae, Korean J. Chem. Eng. 31 (2014) 1425–1432.
[40] W.J. Henley, K.M. Major, J.L. Hironaka, Response to salinity and heat stress in two halotolerant chlorophyte algae, J. Phycol. 38 (2002) 757–766.
[41] I. de Godos, Z. Arbib, E. Lara, F. Rogalla, Evaluation of High Rate Algal Pond for treatment of anaerobically digested wastewater: effect of CO_2 addition and modification of dilution rate, Water Res. 220 (2016) 253–261.
[42] A. Mehrabadi, M.M. Farid, R.C. Craggs, Effect of CO_2 addition on biomass energy yield in wastewater treatment high rate algal mesocosms, Algal Res. 22 (2017) 93–103.
[43] E. Uggetti, B. Sialve, J. Hamelin, A. Bonnafous, J.-P. Steyer, CO_2 addition to increase biomass production and control microalgae species in high rate algal ponds treating wastewater, J. CO_2 Util. 28 (2018) 292–298.
[44] J. Piiparen, D. Barth, N.T. Eriksen, S. Teir, K. Spilling, M.G. Wiebe, Microalgal CO_2 capture at extreme pH values, Algal Res. 32 (2018) 321–328.

Environmental Science and Pollution Research (2021) 28:62185–62199
https://doi.org/10.1007/s11356-021-14927-x

RESEARCH ARTICLE

Potential application and beneficial effects of a marine microalgal biomass produced in a high-rate algal pond (HRAP) in diets of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*

Giulia Pascon[1] · Maria Messina[1] · Lisa Petit[4] · Luisa Maria Pinheiro Valente[2,3] · Beatriz Oliveira[2,3] · Cyrille Przybyla[4] · Gilbert Dutto[5] · Francesca Tulli[1]

Received: 14 October 2020 / Accepted: 11 June 2021 / Published online: 29 June 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Microalgae have been used as live food in aquatic species. In recent years, the interest in microalgae has considerably increased, thanks to the evolution of production techniques that have identified them as an ecologically attractive aquafeed ingredient. The present study provides the first data about the effects of dietary inclusion of a microalgae consortium grown in a high-rate algal pond system on zootechnical performance, morphometric indices, and dietary nutrient digestibility as well as morphology and functionality of the digestive system of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. A dietary treatment including a commercial mono-cultured microalgae (*Nannochloropsis* sp.) biomass was used for comparison. Six hundred and thirty-six European sea bass juveniles (18 ± 0.28 g) were randomly allotted into 12 experimental groups and fed 4 different diets for 10 weeks: a control diet based on fish meal, fish oil, and plant protein sources; a diet including 10% of *Nannochloropsis* spp. biomass (100 g/kg diet); and two diets including two levels (10% and 20%) of the microalgal consortium (100 and 200 g/kg diet). Even at the highest dietary inclusion level, the microalgal consortium (200 g/kg diet) did not affect feed palatability and fish growth performance. A significant decrease in the apparent digestibility of dry matter, protein, and energy was observed in diets including 10 and 20% of the microalgal consortium, but all fish exhibited a well-preserved intestinal histomorphology. Moreover, dietary inclusion with the microalgal consortium significantly increased the enzymatic activity of maltase, sucrase-isomaltase, and ɤ-glutamil transpeptidase in the distal intestine of the treated European sea bass. Algal consortium grown using fish farm effluents represents an attempt to enhance the utilization of natural biomasses in aquafeeds when used at 10 % as substitute of vegetable ingredients in diet for European sea bass.

Keywords Microalgae consortium · *Nannochloropsis* spp. · *Oocystis* sp. · Gut physiology · Diet digestibility · Water treatment · European sea bass

Introduction

Aquaculture plays a key role in supporting human nutrition (Olsen 2011), and the increased availability of raw materials for feed formulation is required to support its rapid and continuous growth. For this reason, research has been focused, for a long time, on finding alternative ingredients to the traditional ones used by the feed industry to reduce pressure on natural

Responsible Editor: Ta Yeong Wu

✉ Maria Messina
maria.messina@uniud.it

[1] Department of Agricultural, Food, Environmental and Animal Sciences, University of Udine, 33100, Udine, Italy

[2] CIIMAR, Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Universidade do Porto, 4450-208 Matosinhos, Portugal

[3] ICBAS, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal

[4] MARBEC, Univ. Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, Palavas les flots, Laboratoire L-3AS, 34250 Palavas-les-Flots, France

[5] IFREMER French Research Institute for Exploitation of the Sea, Laboratoire Service d'Expérimentations Aquacoles, 34250 Palavas les flots, France

resources while addressing the growing market demand for aquaculture products. Management of sustainable feeding practices for aquatic organisms involves, both from a technical and an economic point of view, identifying alternative resources that consider the nutritional profile and the effects on animal welfare (resistance to stress and disease), while preserving the nutritional quality of the seafood product. It also implies the management of livestock activities waste into the environment (FAO 2018).

The use of microalgae as a potential ingredient of aquafeeds could represent an ecologically attractive alternative not only to traditional ingredients of marine and plant origin (Becker 2007) but also to innovative ingredients such as insects, seaweeds, and yeasts. In addition to their basic nutritional value (Spolaore et al. 2006), the inclusion of microalgae in aquafeeds is becoming popular as feed supplements in the aquaculture sector (Chu 2012; Priyadarshani and Rath 2012), thanks to the functional properties of their pigments and bioactive compounds. In addition, they may have a high content of proteins (30–70%), lipid (10–20%), and essential fatty acids (Becker 2007; Nasir et al. 2015; Shah et al. 2018; Cardinaletti et al. 2018). The main microalgal cultured genera are *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Scenedesmus*, *Arthrospira*, *Tisochrysis*, and *Tetraselmis* (Sirakov et al. 2015; Bleakley and Hayes 2017), thanks to their nutritional and health properties and consolidated cultivation technology. Recently, Castro et al. (2020) have proved that the inclusion up to 15 % of *Nannochloropsis* sp. in diets for European sea bass has decreasing effects on the liver and intestinal antioxidant activity, while Abdelghany et al. (2020) have demonstrated that dietary *N. oculata* significantly improves growth parameters and resistance to pathogens such as *Aeromonas veronii* in Nile tilapia (*O. niloticus*).

However, the use of microalgae as an ingredient of aquafeeds may imply a few drawbacks such their high costs. In the recent decades, many biotechnological processes have emerged that are based on microalgal cultures and significant both from the environmental and industrial point of view. Such processes include biogas enrichment and purification; wastewater treatment (Quijano et al. 2017); CO_2, NOx, and SOx removal from flue gas (Yen et al. 2015); and recovery of added-value products such as pigments, nutraceuticals, fertilizers, and biofuels (Bahr et al. 2013). The traditional processes for wastewater treatment are very expensive due to the chemical additives required during each phase. However, the cost could be minimized by using the microalgae biomass obtained by this technology as a feed for aquaculture. Some researchers have thus studied the potential value of multiple applications of microalgae to contribute to a circular economy approach (Valente et al. 2019) through their use in wastewater treatment (Velichkova et al. 2014; Nasir et al. 2015) and the sustainable production of biofuels (Rawat et al. 2011; Oliveira et al. 2020).

Numerous studies have been conducted on the characteristics of the microalgae obtained by a phycoremediation process (Yaakob et al. 2014; Nasir et al. 2015; Badr et al. 2019; Apandi et al. 2019; Michelon et al. 2021). Phycoremediation is a biotechnological process to remove contaminants from wastewater and is considered a simpler method than the conventional one (Raskin et al. 1997; Atiku et al. 2016). Microalgae have already been used to remove inorganic molecules and improve water quality (Ruiz-Martinez et al. 2012). Moreover, wastewater from the fish farm and the fresh market has also been used as a medium for a non-axenic microalgae culture (Apandi et al. 2019; Andreotti et al. 2017; Michels et al. 2014).

In general, wastewater contains a high level of nutrients (nitrogen, phosphorus, and carbon) and organic matter, which act as elements to support microalgae biomass (Riaño et al. 2016); nitrogen availability has been shown to improve biomass production (Maizatul et al. 2017), thus modulating their nutritional value. Michels et al. (2014) used the wastewater obtained from a fish farm as a culture medium for the non-axenic production of *Tetraselmis suecica* biomass that in turn was used in juvenile shellfish culture resulting in increased productivity and constant quality in the hatchery phase. Several processes at pilot or industrial scale are actually based on non-axenic microalgae cultures from wastewater treatment, biogas purification/upgrading, or flue gas treatment. Moreover, recent studies have proved that microalgae biomass and composition, such as lipid composition, can be adjusted under physiological stress conditions, namely nitrogen depletion with increased salinity and/or increased salinity with temperature shock (Markou et al. 2016; Anitha et al. 2018). In non-axenic production processes, both microalgal and bacterial communities play key roles (Coronado-Apodaca et al. 2019), and the combination of different microalgal species can provide a balanced diet and improve animal growth and welfare (Spolaore et al. 2006; Cardinaletti et al. 2018). Cultivating microalgae in a high-rate algal pond (HRAP) system is a simple and economic way to produce valuable biomass to be included in aquafeeds. It provides fish farm wastewater treatment allowing the re-use of water for aquaculture while providing free nutrients for microalgae biomass production (Craggs et al. 2014). In addition, the technological treatment of microalgae biomass could also represent an important source of proteins, n-3 rich lipids, antioxidants, and natural bioproducts.

In this context, this study aimed to test the effects of dietary inclusion of a microalgae consortium grown in a HRAP system on zootechnical performance, morphometric indices, and dietary nutrient digestibility, as well as on the morphology and functionality of the digestive system of European sea bass. A dietary treatment including the commercial mono-cultured microalgae *Nannochloropsis* sp. was used for comparison,

based on its nutritional properties and, in particular, n-3 PUFA content.

Materials and methods

Microalgae consortium production and characterization

The trial was conducted at the Ifremer experimental station in Palavas les Flots, France. The microalgae consortium was cultivated in a conventional oval-shaped raceway HRAP. Water mixing in the HRAP (140 m^2 and 60 m^3) was maintained at 0.2 m^3/s using a vacuum airlift column developed and patented by COLDEP® (Barrut et al. 2012; Barrut et al. 2013). The column was connected to the HRAP and consisted of a central tube, the top of which was hermetically closed and connected to a vacuum pump. Water was raised to the top of the central tube with a vacuum and allowed to flow over the central tube so that it could be returned to the HRAP (Fig. 1). The raceway was initially filled with natural marine water filtered at 30 μm and supplied with an effluent profile corresponding to European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) breeding tanks providing 80 g N/day and 30 g P/day for 75 days. The total biomass profile consisted of 2000 fish of 80±2.3 g (average body weight) fed with a fixed daily rate (1.2% of the biomass). The experimental natural consortium of marine microalgae was grown under a natural irradiance directed by the local weather at 43° 31′ 59.98″ N, 3° 55′ 59.99″ E in autumn 2017 in France on the western Mediterranean coast. CO_2 addition flow was adjusted by an automatic pH detection device which was adjusted to photosynthetic demand based on pH level monitoring (Galès et al. 2020).

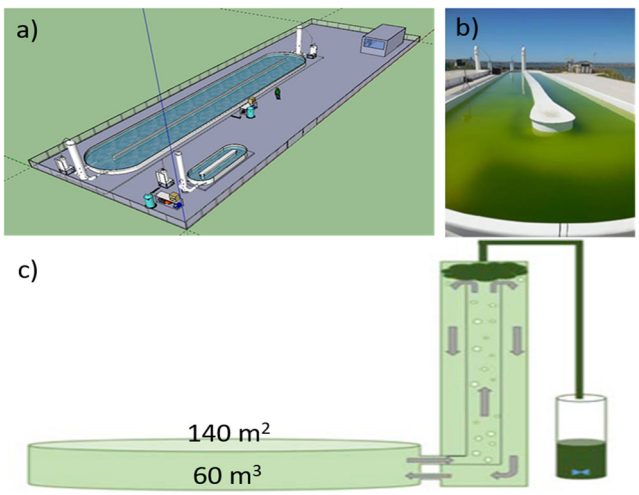


Fig. 1 High-rate algal pond. (a) general view; (b) picture of the consortium culture; (c) crossing section view with COLDEP® column and harvest collector

Chlorophyll a concentrations were measured (Lorenzen 1967) twice a week during the exponential period of growth, corresponding to the sample collection period. The data showed an increasing concentration from 0.8 to 3.5 mg/L of chlorophyll a. Culture productivity calculated on the sampling period was 2.53 $g/m^2/day$. Algal consortium biomass was weekly sampled until 5 kg of dried biomass was obtained. Natural algae concentration was preconcentrated using COLDEP® column (around 10- to 20-fold depending on the culture stage) and centrifuged using a plate divider Alfa Laval "Clara15" to obtain a paste featuring an approximate 7% dryness. Residual water was extracted by freeze-drying, and the final product was ground to obtain a meal mesh comparable to the industrial fish meal. The dried consortium biomass (5 kg) was defined in terms of nutrients before being used at graded levels in formulated feeds satisfying the European sea bass nutritional requirements (Peres and Oliva-Teles 1999a).

The species composition of the consortium was determined using 18S rRNA gene analysis. For each experimental run, 10mL samples were filtered through 0.2μm membranes (PALL ALL Supor® 200 PES), the membranes being stored at −20 °C for subsequent DNA extractions. The DNA was extracted using DNeasy PowerWater Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The V4 region of the 18S rRNA gene was amplified over 30 amplification cycles at an annealing temperature of 65°C, with forward and reverse primers (5′-CTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTGCGGTAATTCCAGCTCCAA-3′ and 5′-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGGCAAATGCTTTCG C-3′, respectively). The resulting products were purified and loaded onto an Illumina MiSeq cartridge for sequencing, paired with 300bp reads following the manufacturer's instructions (v3 chemistry). Sequencing and library preparation steps were carried out at the Genotoul Lifescience Network Genome and Transcriptome Core Facility in Toulouse, France (get.genotoul.fr). A modified version of the standard operation procedure for MiSeq data (Kozich et al. 2013) in Mothur version 1.35.0 (Schloss et al. 2009) was used for alignment and taxonomic outline. Mothur was also used to identify representative sequences of operational taxonomic units (OTUs).

Test ingredients and diets

Four diets were formulated to be isoproteic (48.5%±0.8) and isolipidic (18.3%±0.5). As a control diet (C), a formulation was used that simulated a commercial diet containing fish meal and oil and vegetable-derived protein mix, including solvent-extracted soybean meal, pea protein concentrates, and wheat meal. The microalgae consortium was included to partially replace the vegetable-derived protein mix in diet

Table 1 Ingredients (g/kg) and proximate composition, phosphorus and energy content of the test diets

	CTRL	MC10	MC20	N10
Ingredients				
Fishmeal Chile prime	25.25	25.25	25.25	25.25
Vegetable mix§	37.87	35.05	34.03	36.02
Wheat gluten meal	4.04	5.05	5.05	0.00
Wheat meal	17.17	9.09	0.00	14.74
Fish oil	13.94	13.73	13.73	12.12
Microalgal consortium	0.00	10.10	20.20	0.00
Nannochloropsis sp.#	0.00	0.00	0.00	10.10
Min. and Vit. supplement$	1.00	1.00	1.00	1.00
Yttrium oxide	0.02	0.02	0.02	0.02
Binder	0.20	0.20	0.20	0.20
L-Methionine	0.50	0.50	0.50	0.50
Chemical composition				
Dry matter (%)	96.94	96.87	97.17	97.12
Protein (% DM)	49.17	49.26	47.61	48.24
Lipids (% DM)	18.14	17.84	18.18	19.12
Ash (% DM)	7.84	12.80	18.33	10.29
Phosphorus (% DM)	1.03	1.07	1.11	1.13
Gross energy (MJ/kg)	23.10	22.20	21.20	22.80

§Vegetable mix: including soy protein concentrate, pea protein concentrate, solvent extracted soybean meal in a 4:1:4 ratio

#*Nannochloropsis* from GREENSEA, Meze-Fr

$Mineral supplement composition (% mix): $CaHPO_4*2H_2O$, 78.9; MgO, 2.725 g; KCl, 0.005; NaCl, 17.65; FeCO3, 0.335; $ZnSO_4*H_2O$, 0.197; $MnSO_4*H_2O$, 0.094; $CuSO_4*5H_2O$, 0.027; Na_2SeO_3, 0.067

Vitamin supplement composition (% mix): thiamine HCL Vit B1, 0.16; riboflavin, Vit B2, 0.39; pyridoxine HCL Vit B6, 0.21; cyanocobalamine B12, 0.21; niacin Vit PP, 2.12; calcium pantotenate, 0.63; folic acid, 0.10; biotin Vit H, 1.05; myoinositol, 3.15; stay C Roche, 4.51; tocoferol Vit E, 3.15; menadione Vit K3, 0.24; Vit A (2500 UI/kg diet) 0.026; Vit D3 (2400 UI/kg diet) 0.05; choline chloride, 83.99

MC10 (10% replacement) and diet MC20 (20% replacement) (Table 1).

A diet (N10) including 10% of commercial *Nannochloropsis* sp. dry biomass was used for comparison. *Nannochloropsis* sp. cells were cultivated in a photobioreactor using industrial chemical fertilizer. The spray-dried *Nannochloropsis* biomass was provided by an industrial algae farm (GREENSEA, Meze-Fr).

Diets were supplemented with L-methionine so that the sulfur amino acid level met the requirements of the European sea bass (Tulli et al. 2010). Yttrium oxide (20 mg/100 g diet) was added as an indigestible marker to assess nutrients and energy digestibility of the test diets. The diets were manufactured by INRA in Donzacq (F) as standardized 2mm pellets. The ingredients and proximate composition of the experimental diets are shown in Table 1.

Experimental animals and feeding trial

Six hundred thirty-six European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles were purchased from a commercial hatchery (Poissons du Soleil, Balaruc les-Bains, France).

After 3 weeks of acclimation to the experimental conditions, the fish (average initial body weight 18.0 ± 0.28 g) were randomly allotted among 12 cylindrical tanks, featuring a volume of 1 m^3 each (53 fish per tank) and equipped with a collection tube for feces and uneaten pellets in a recirculation aquaculture system (RAS), thus ensuring optimal water conditions for European sea bass (Table 2), and were fed a commercial diet. At the beginning of the feeding trial, the fish were individually implanted with a microchip (Biomark Inc., ID, USA) under moderate anesthesia (90 ppm benzocaine) (Topic Popovic et al. 2012).

The fish were assigned to fish groups/tanks according to a completely random design with diets as the main factor and three replicates per treatment and hand-fed the experimental diets starting on 28th March 2018 over 75 days to apparent satiation in 3 daily meals from 8 am to 2 pm. The fish were group-weighed every 4 weeks and at the end of the feeding trial, under moderate anesthesia after 40hours fasting. Relative feed intake (RFI= feed intake/[(Initial body weight +Final body weight) × 0.5 × days]), specific growth rate (SGR= 100 × (ln Final body weight − ln Initial Body Weight)/days), feed conversion ratio (FCR= feed intake/weight gain), protein efficiency ratio (PER= weight gain/protein intake), and gross protein retention (GPR= 100 × [(final body protein content-initial protein content)/protein intake]) were calculated.

At the end of the feeding trial, after 40hours fasting, 3 fish per tank (9 fish per dietary treatment) were sacrificed with a lethal solution of benzocaine (200 ppm; Vignet et al. 2014). Individual weight and length and viscera, liver, and mesenteric fat weight were recorded. The intestinal tract was excised for histological and physiological evaluations: Fulton's condition index (K= body weight/standard length^3), viscerosomatic index (VSI= 100 × viscera weight/body

Table 2 Average and range values of physico-chemical water parameters over 75 days

Parameter	Average	Min.	Max.
Salinity (g/L)	35.3	27.8	39.1
Temperature (°C)	22.8	19.7	23.2
pH	7.1	6.5	7.6
Dissolved oxygen (mg/L)	7.6	5.6	6.7
$N\text{-}NH_3$ (ppm)	0.3	0.1	0.8
$N\text{-}NO_2$ (ppm)	0.0	0.0	0.0
$N\text{-}NO_3$ (ppm)	1.4	0.4	3.3
$P\text{-}PO_4$ (ppm)	0.1	0.0	0.2

weight), hepatosomatic index (HSI= 100 × liver weight/body weight), mesenteric fat index (MFI= 100 × mesenteric fat/body weight), and carcass yield = 100 × carcass weight/body weight were calculated.

Diet digestibility evaluation

To evaluate the in vivo nutrient digestibility of the test diets, fish feces were daily collected from each tank during the last 3 weeks of the feeding trial and preserved at −20°C until used. Fecal biomass was centrifuged (10 min at 3000×*g* at 4°C), freeze-dried, and stored (−20 °C) until analyzed. Feed and feces were analyzed for dry matter (AOAC 934.01), protein (AOAC 2001.11), lipids (AOAC 2003.05), and energy (ISO 9831-1998) (IKA – C7000) content. Yttrium concentration in feed and feces was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) according to Carignan et al. (2001). Apparent digestibility coefficients (ADCs) of dry matter, protein, lipid, and energy of the diets were calculated according to the following formula:

$$\mathrm{ADC} = 1 - \left[\left(\frac{F}{D}\right) * \left(\frac{Di}{Fi}\right)\right]$$

where D = % of the nutrient or kJ/g of the energy in the diet; F = % of the nutrient or kJ/g of the energy in the feces; Di = % Y in the diet; and Fi = % Y in the feces (Cho et al. 1982).

Gut histology

Two fish from each tank were used for histologic analyses. Fish gut was dissected, and proximal intestine samples were collected from below the pyloric caeca (0.5cm fragment). Samples were fixed in 4% neutral-buffered formaldehyde and embedded in paraffin. Cross sections of each sample were cut (3 μm thick) in a semi-automated rotary microtome (Leica RM 2245). Slides were then dewaxed and stained with specific Alcian Blue/PAS (pH=2.5). Micrographs of each section were obtained through slides scanning using a VS120 Virtual Slide Microscope (20× magnification). On each intestinal section, the following parameters were measured in two sections of each sample by using imaging software Olympus cellSens Dimension Desktop: cross-sectional area; muscularis externa thickness (inner circular and outer longitudinal muscle layers); fold length and width and goblet cell presence, as previously described (Batista et al. 2020a, b) (Fig. 2). Briefly, the muscularis externa was measured in eight points of each cross section, and the mean value was considered; the eight highest folds in each section were selected to measure their length and width. Goblet cells (mucus-producing cells) were counted in the eight selected folds (blue and magenta cells), and the average number of goblet cells per fold was determined.

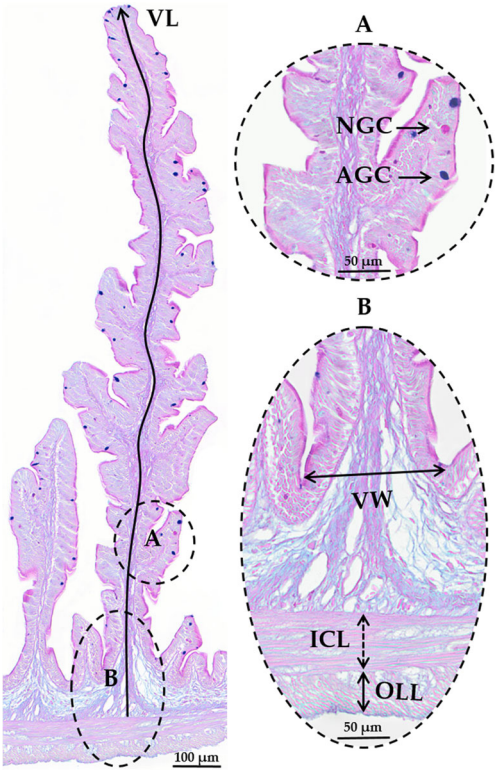


Fig. 2 Anterior intestine histological sections (Alcian Blue/PAS staining, pH = 2.5) of European sea bass. Villus length (VL), muscularis externa (outer longitudinal layer OLL and inner circular layer ICL); villus width (VW), Goblet cells (acid AGC and neutral NGC)

The activity of the brush border membrane (BBM) enzymes

One fish per tank was used to obtain the digestive tract that was divided into pyloric *caeca* (PC), proximal intestine (P, the section from below the PC to the increase in diameter indicating the start of the distal intestine), and distal intestine (D, the terminal part of the intestine with a larger diameter, reaching the anus). When necessary, the remaining feed residues were gently squeezed out. Tissue samples were lightly blotted with absorbent paper, put in individual plastic tubes, and stored at −20°C until the analysis of the BBM enzyme activity was performed. The extraction of the BBM enzymes and the analysis of maltase, sucrase-isomaltase (SI), γ-glutamyl transpeptidase (γ-GT), and alkaline phosphatase (ALP) were carried out as reported by Messina et al. (2019). One unit (U) of enzyme activity corresponded to the amount of enzyme that transforms or hydrolyses 1 μmol of substrate/mL/min. The specific enzymatic activity was calculated as U = μm/min/mg of supernatant protein for maltase and sucrase-isomaltase and mU for ALP and γ-GT.

The amount of total protein in the supernatant was determined according to Bradford et al. (1976) by using Bradford reagent (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) and bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) as a standard.

Statistical analysis

Data are expressed as average ± standard deviation. Zootechnical and digestibility data were analyzed by one-way ANOVA to test statistical significance within the main factor. BBM enzyme activity data were analyzed by a two-way ANOVA test, considering the dietary treatment and the intestinal section as main factors. If appropriate, Duncan's post hoc test was applied at a significant level of 95%. IBM-SPSS statistical package (release 17.0) was used to carry out data analysis.

Results

Marine consortium characterization

The consortium biomolecular characterization identified 34 assignments with 6 dominant algal species (Table 3). The main species of the natural consortium were as follows: *Oocystis* sp., *Chlorella stigmatophora*, *Tetraselmis* sp. Depending on the open pond culture cycle and the season, *Isochrysis* sp. and *Phaeodactilum tricornutum* were observed in the minority.

The chemical composition of the dried consortium biomass is shown in Table 4. The consortium was characterized by 2.8% nitrogen and 3.2% total lipid. Oleic (16.8% FAMEs) and linolenic (12.4% FAMEs) acids were the main fatty acids. The free amino acid fraction was dominated by proline, alanine, arginine, and glutamate (42.0, 21.3, 16.0, 16.5 nmol/mg, respectively). Natrium, iron, and boron were the most abundant elements in the mineral fraction.

Fish growth performance

During the experimental period, the fish easily accepted the experimental diets, and mortality was negligible. Growth performance, RFI, FCR, and PER of the European sea bass juveniles fed with the experimental diets over 75 days are shown in Table 5. The fish fed with diet MC10 exhibited a significantly higher final body weight as compared to those fed with the control diet (64.9 vs 61.0 g; $P<0.05$), while the SGR value in MC10, though being the highest, did not reach statistical significance ($P = 0.066$). The fish fed with diet MC20 exhibited the highest relative feed intake (18.4 g/kg ABW/day), a significantly different value from the RFI of the C group that showed the lowest one (16.7 g/kg ABW/day) ($P<0.05$). Feeding diet MC20 also resulted in a significant increase in FCR values as compared to the other dietary treatments (1.25 vs 1.15 respectively, $P = 0.0052$). On the contrary, PER was significantly lowered by the microalgae inclusion in the MC20 group compared to diet C and Nannochloropsis-including diet (1.73 vs 1.83, $P<0.05$). GPR was not affected by the experimental diets.

The biometric morphometric index values calculated at the end of the trial on European sea bass did not reveal any significant effects of the experimental diets (Table 6).

Diet digestibility

The dry matter, protein, lipid, and energy ADCs of the experimental diets are shown in Table 7. Diet N, including 10% of *Nannochloropsis* sp., resulted in ADC values similar to the ones observed in the reference C diet (74.2, 92.2, 85.4, and 85.8 %, respectively for dry matter, protein, lipid, and energy).

Table 3 Taxonomic composition of the marine consortium

	Quantity (%)	Properties	Reference
Algae			
Oocystis sp.	80.32	High EPA	Anthony and Stuart 2015
Tetraselmis sp.	6.06	High EPA and ARA	Vizcaíno et al., 2016
Chlorella stigmaphora	2.06	High EPA	Anthony and Stuart 2015
Chlamydomonas sp.	1.22	Mineral (boric acid and calcium)	Kliphuis et al. 2012
Nannochloropsis gaditana	0.06	15% EPA	Anthony and Stuart 2015
Nannochloris sp.	0.06	35% EPA	Anthony and Stuart 2015
Others			
Rotifera	5.84	Monounsaturated fatty acid	Awaiss et al. 1992
Lacrymariidae (ciliated)	2.09	x	
Cinerochilidae (Phylasterides)	2.07	x	
Chytridiomycotina (Chytridiomycota)	0.18	x	
Strombidiidae (ciliated)	0.02	x	
Isochrysis	Traces	x	
Phaeodactylum tricornutum	Traces	x	

Table 4 Major chemical characteristics of the dried marine consortium biomass

Nitrogen (%)	2.8	
Lipid (%)	3.2	
Gross energy (kJ/g)	9.0	
Fatty acids (% FAMEs)		
18:1 n-9	16.8	
16:3 n-3	4.3	
16:4n-3	1.9	
18:3n-3	12.4	
20:3n-3	1.1	
20:4n-3	1.1	
20:5n-3	9.1	
22:5n-3	0.2	
SFA	24.0	
MUFA	32.0	
PUFA	42.0	
n-3	33.0	
n-6	8.0	
Amino acids (nmol/mg)	Free	Hydrolysed
Arginine	16.0	66.0
Histidine	0.0	15.0
Lysine	3.0	47.0
Threonine	1.6	50.0
Isoleucine	1.0	40.0
Leucine	1.0	40.0
Valine	2.0	64.0
Methionine	1.0	14.0
Phenylalanine	1.0	37.0
Tryptophan	0.0	0.0
Alanine	21.3	111.0
Tyrosine	1.0	20.0
Aspartate	1.2	82.0
Glutamate	16.5	92.0
Glycine	4.3	101.0
Serine	3.3	51.0
Proline	42.0	88.0
Minerals (μg/g)		
B	55.1	
Ca	6.4	
Cd	0.4	
Co	2.9	
Cr	1.1	
Cu	5.2	
Fe	84.8	
K	10.4	
Mg	16.7	
Mn	9.6	
Na	120.5	
Ni	0.3	
P	5.2	
Zn	8.0	
Carbohydrates (%)		
Galactose	1.9	
Glucose	6.6	
Mannose	2.2	
Xylose	1.9	
Fucose	<0.5	
Rhamnose	7.5	
Gluconic acid	1.2	

On the contrary, increasing the dietary inclusion of the marine consortium resulted in a significant decrease in dry matter, protein, lipid, and energy ADCs as observed in MC10 (65.9, 90.0, 82.8, 80.1 % respectively) and MC20 (57.7, 85.2, 84.9, 75.2 % respectively) diets ($P<0.05$).

Intestine morphology

The fish fed with the experimental diets did not exhibit major alterations in intestinal morphology, as shown in Table 8. Most of the traits considered did not vary significantly among the dietary treatments ($P>0.05$), and the intestine from all sampled fish showed a well-preserved morphology. A significant reduction in the total number of acid goblet cells per fold was registered in the fish fed with the highest consortium dietary inclusion level as compared to those fed with the control diet (36.77 vs 64.29 n. GC/fold respectively for MC20 and C, $P<0.05$) (Fig. 3).

The activity of the intestinal brush border membrane enzymes

The activity of maltase, SI, -γGT, and ALP varied depending on the intestinal tracts (Fig. 4). The PC was the major site of activity for all enzymes studied. In this tract, the diet containing 10% of *Nannochloropsis* sp. resulted in a significant decrease of the maltase activity as compared to the control diet (3.83 vs 6.41 U, $P<0.05$).

In the distal portion of the intestine, the activity of SI and maltase showed a similar pattern and their activity resulted significantly enhanced in the fish fed with the consortium-including diets as compared to diet C (2.05 vs 0.96 U and 3.63 vs 1.76, respectively, $P<0.05$).

The dietary treatment considerably affected the activity of γ-GT in the PC. The highest value was observed in the fish fed with the MC10 diet ($P=0.001$). The activity of ALP was not affected by the dietary treatments ($P > 0.05$).

The effect of the two main factors (diet and intestinal tract) was tested on the brush border membrane enzyme activity of the European sea bass fed with the experimental diets. The two-way ANOVA results are summarized in Table 9. A

Table 5 Zootechnical performance of European sea bass fed the experimental diets over 75 days

	CTRL	MC10	MC20	N10	P
Mortality (%)	1	0	1	0	
Initial body weight (g)	18.00 ± 1.10	18.50 ± 0.90	18.50 ± 1.20	18.40 ± 1.00	0.088
Final body weight (g)	61.0 ± 11.00b	64.9 ± 13.40a	63.4 ± 12.80ab	63.70 ± 12.70ab	0.024
RFI (g/kg ABW/day)[1]	16.70 ± 0.60b	17.4 ± 0.10ab	18.4 ± 0.30a	17.30 ± 0.30ab	0.018
SGR (%)[2]	1.65 ± 0.02	1.70 ± 0.01	1.66 ± 0.03	1.68 ± 0.02	0.066
FCR[3]	1.15 ± 0.03b	1.16 ± 0.01b	1.25 ± 0.03a	1.16 ± 0.03b	0.005
PER (%)[4]	1.82 ± 0.04a	1.80 ± 0.02ab	1.73 ± 0.04b	1.84 ± 0.05a	0.007
GPR (%)[5]	32.09 ± 1.75	31.33 ± 0.87	30.05 ± 1.76	29.10 ± 1.28	0.075

Data are presented as mean ± standard deviation; values with different letters on the same row are significantly different ($P < 0.05$), n= 3

[1] $RFI\ (Relative\ Feed\ Intake) = \frac{\text{feed intake}}{(\text{Initial Body Weight} + \text{Final Body Weight}) \times 0.5 \times \text{days}}$

[2] $SGR\ (Specific\ Growth\ Rate) = 100 \times \frac{\ln\text{Final Body Weight} - \ln\text{Initial Body Weight}}{\text{days}}$

[3] $FCR\ (Feed\ Conversion\ Ratio) = \frac{\text{feed intake}}{\text{weight gain}}$

[4] $PER\ (Protein\ Efficiency\ Ratio) = \frac{\text{weight gain}}{\text{protein intake}}$

[5] $GPR\ (Gross\ Protein\ Retention) = 100 \times \left[\frac{(\text{Final Body protein content} - \text{Initial Body protein content})}{\text{protein intake}}\right]$

significant interaction between the main factors was revealed for maltase and γ-GT.

Discussion

The interest in the use of microalgae dry biomass in aquafeeds is recent; several studies already tested the effects of their dietary inclusion in the in vivo trials on different fish species (Hussein et al. 2013; Eryalçın and Yıldız 2015; Haas et al. 2016; Kissinger et al. 2016; Vizcaíno et al. 2016a; Sarker et al. 2020).

Different microalgae species such as *Gracilaria gracilis*, *Nannochloropsis oceanica*, *Tisochrisis lutea*, and *Tetraselmis suecica* have been used as partial replacement of fish meal in diets for European sea bass with no adverse effects on zootechnical performance and intestinal physiology (Cardinaletti et al. 2018; Messina et al. 2019; Valente et al. 2019; Batista et al. 2020a). *Isochrysis* sp. has also been proposed as a source of n-3 PUFA in partial substitution of fish meal in diets for European sea bass without any effects on feed intake and zootechnical performance (Tibaldi et al. 2015). Similar results in the same fish species have been obtained by Haas et al. (2016) when part of fish oil was substituted by *Pavlova viridis* and *Nannochloropsis* sp. Moreover, treatment with microalgae in this trial did not affect the histological aspect of the liver and intestine. Studies carried out on rainbow trout have demonstrated the effectiveness of microalgae when included at low levels in the diets. Sarker et al. (2020) demonstrated that *Isochrysis* sp. and *Schizochytrium* sp. are possible candidates for DHA supplementation in rainbow trout diet formulations, while Sheikhzadeh et al. (2012) showed that dietary *Haematococcus pluvialis* might enhance the antioxidant system when added at 0.3 %.

Table 6 Biometric morphometric indices of European sea bass fed the experimental diets over 75 days

Biometric index	CTRL	MC10	MC20	N10	P value
K[1]	1.72 ± 0.11	1.73 ± 0.11	1.70 ± 0.10	1.73 ± 0.12	0.108
HSI (%)[2]	1.18 ± 0.31	1.03 ± 0.27	1.02 ± 0.28	1.27 ± 0.70	0.539
VSI (%)[2]	10.0 ± 1.20	9.54 ± 1.00	9.64 ± 1.90	11.0 ± 1.90	0.162
MFI (%)[2]	5.93 ± 1.12	5.18 ± 0.90	4.85 ± 1.13	5.77 ± 2.13	0.344
Carcass yield (%)[2]	82.89 ± 2.28	84.26 ± 1.90	83.75 ± 2.29	81.19 ± 3.76	0.101

Data are presented as mean ± SD; values with different letters in the same row are significantly different ($P < 0.05$) n=9

[1] $K\ (Fulton's\ Condition\ Index) = \frac{\text{body weight}}{\text{std lenght}^3}$

[2] $HSI, VSI, MFI, Carcass\ Yield = 100 \times \frac{\text{weight of liver,viscera,mesenteric fat,carcass}}{\text{body weight}}$

Table 7 Nutrient and energy apparent digestibility coefficients (%) of the experimental diets

	CTRL	MC10	MC20	N10	P value
Dry matter	76.7 ± 1.0a	65.9 ± 2.0bc	57.7 ± 6.2c	74.2 ± 1.1ab	0.000
Protein	92.7 ± 0.3a	90.0 ± 0.5b	85.2 ± 1.2c	92.2 ± 0.1a	0.000
Lipid	86.8 ± 0.2a	82.8 ± 0.8b	84.9 ± 2.3ab	85.4 ± 0.3ab	0.023
Energy	87.4 ± 0.9a	80.1 ± 1.3b	75.2 ± 3.4c	85.8 ± 0.8a	0.000

Data are presented as mean ± SD; values with different letters in the same row are significantly different ($P < 0.05$) n=3

However, contrary to the vast majority of studies with microbial biomass, the marine consortium tested in the present study consisted of a certain number of different organisms, namely *Oocystis* sp. (80%), *Tetraselmis* sp. (6%), *Chlorella stigmaphora*, *Chlamydomonas* sp., *Nannochloropsis gaditana*, *Nannochloris* sp., Rotifera, Lacrymariidae (ciliated), Cinerochilidae (phylasterides), Chytridiomycotina (Chytridiomycota), and Strombidiidae (ciliated). The analysis method cannot precisely define the *Oocystis* species, but whereas *Oocystis* sp. is generally associated with a freshwater genus of green microalgae, oceanic strains can be found in marine or brackish water such as *Oocystis submarina* (Śliwińska-Wilczewska and Latała 2018) or *Oocystis borgei* which could inhibit harmful microalgae by expressing allopathic effects (Wang et al. 2020). *Oocystis heteromucosa* belongs to strains of marine algae consortium found in marine aquaculture pond wastewater with a high ammonia tolerance (Katayama et al. 2020). In a HRAP, algae predators such as rotifers can have a negative effect on the consortium growth to the point of cultural annihilation. That was not the case in our experiment: we hypothesize that continuous CO_2 delivery linked to the photosynthetic demand maintains a pH value around 7, which could be uncomfortable for organism reproduction adapted to marine pH at 8.2. In addition, the culture did not collapse, probably because of the high culture volume and dynamic algae growth. Previous experiments showed that the algae cells' reproduction rate has to be higher than the total grazers' reproduction rate in order to keep a culture alive (Strom and Morello 1998). That was the case in the exponential culture growth phase, which is the sample period for biomass extraction. Algae predators also sequester compounds of some interest from algae ingestion and their tolerated presence in the culture contributes to final powder value.

The use of a non-axenic culture of a blend of *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, and *Dunaliella tertiolecta* has been evaluated in its remediation potential for the nutrient assimilation of fish farm wastewater (Andreotti et al. 2017). Dallaire et al. (2007) have previously described the effect on trout fry of the dietary inclusion of a freshwater photosynthetic microorganism consortium (mainly *Scenedesmus* sp. and *Chlamydomonas* sp.) derived from the sedimentation pond of a fish farm. The results showed that a maximum of 12.5% of consortium could be included in the feed formulation without affecting growth or whole-body fish composition. Anyway, to the best of our knowledge, there seem to be no other studies considering the dietary inclusion of a non-axenic multi-species marine consortium in fish feeds. For these reasons, the comparison of the present results with previous research studies is not straightforward and should be done with caution. In any case, the results of the present study are consistent with the ones of Dallaire et al. (2007) as the dietary inclusion of microalgae biomass generally improved fish performance and feed intake, although only the fish fed with the 10% microalgae consortium (MC10) reached a significantly

Table 8 Intestinal morphology of European sea bass fed the experimental diets over 75 days

	CTRL	MC10	MC20	N10	P value
Cross-sectional area (mm^2)	11.2 ± 2.97	11 ± 4.41	9.5 ± 2.29	10.2 ± 1.62	0.761
Villus length (μm)	1414.7 ± 256.7	1416.5 ± 368.5	1327.6 ± 207.9	1240.0 ± 126.6	0.592
Villus width (μm)	226.9 ± 34.76	225.1 ± 32.41	222.3 ± 29.50	225.9 ± 14.85	0.993
Muscularis externa (μm)	131.7 ± 20.45	104.4 ± 21.69	106.5 ± 30.88	129.3 ± 17.68	0.103
Inner circular layer (μm)	85.1 ± 13.23	67.4 ± 14.23	65.6 ± 18.58	81.4 ±10.69	0.069
Outer longitudinal layer (μm)	46.6 ± 8.26	37 ± 7.83	40.9 ± 13.23	47.9 ± 9.40	0.226
Goblet cells (no. GC/fold)	88.8 ± 16.94	67.2 ± 20.55	56.7 ± 13.05	82.2 ± 29.64	0.061
Acid GC (no. GC/fold)	64.3 ± 13.46a	46.4 ± 8.14ab	36.8 ± 6.26b	54.7 ± 17.44ab	0.006
Neutral GC (no. GC/fold)	24.6 ± 15.54	20.8 ± 14.92	19.9 ± 8.13	27.6 ± 15.21	0.760

Data are presented as mean ± SD; values with different letters in the same row are significantly different ($P < 0.05$), n=6

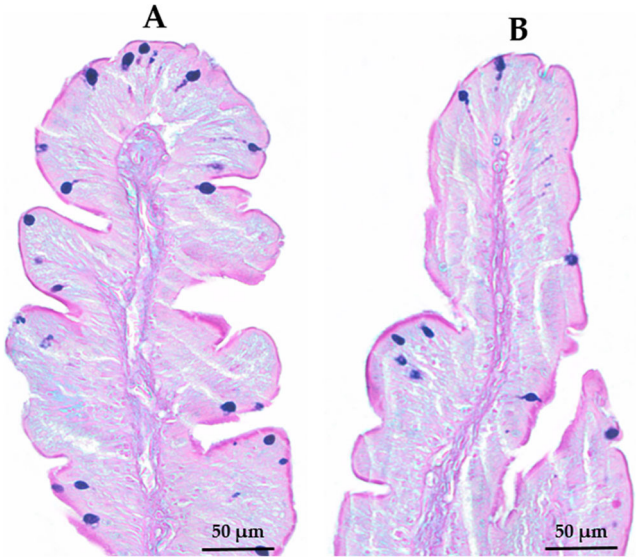


Fig. 3 Anterior intestine histological sections (Alcian Blue/PAS staining, pH = 2.5) of European sea bass at the end of 75-day feeding trial. Blue points represent the acid goblet cells. A, CTRL diet and B, MC20 diet

higher final body weight than the control diet. MC20 diet had a growth performance that did not differ from other treatments but resulted in a significant increase of FCR. Similarly, the rainbow trout fed with diets including 9.5% of a *Nannochloropsis* and *Isochrysis* blend or including also *Schizochytrium* exhibited significantly poorer FCR, a result not unlike those obtained by Walker and Berlinski (2011) on cod or Cardinaletti et al. (2018) on European sea bass.

For the above-mentioned reason, in the present study, a comparison with a test diet including monospecific dried biomass of *Nannochloropsis* spp. has been considered in the experimental design. *Nannochloropsis* sp. is a unicellular microalga with a polysaccharide cell wall (Hibberd 1981) and a promising ingredient in aquafeeds both as a successful

Table 9 ANOVA of the main factors which affect the activity of the BBM enzymes

	Diet	Tract	Diet × Tract
Maltase	*	**	**
Sucrase	*	**	NS
ALP	*	**	NS
γ-GT	**	*	**

*P < 0.05; **P < 0.001

fish oil substitute (Eryalçın and Yıldız 2015; Gbadamosi and Lupatsch 2018; Lozano-Muñoz et al. 2020) and the form of the defatted meal as an alternative to fish meal (Sørensen et al. 2017). Moreover, *N. oceanica* became better digested by European sea bass than other microalgae marine species (Batista et al. 2020b). In the present study, the replacement of terrestrial plant source by *Nannochloropsis* sp. dried biomass did not significantly affect diet palatability, fish growth performance, or biometric indices compared with C diet after a 75-day feeding period, confirming previous observation in the European sea bass fed with 8% of *N. oceanica* (Batista et al. 2020a). A recent study carried out by Valente et al. (2019) showed that the dietary inclusion up to 15% of defatted *Nannochloropsis* sp. biomass can replace fish meal in European sea bass diets without affecting fish growth performance and biometric indices. Moreover, Haas et al. (2016) showed that a 50 % fish oil replacement by *Nannochloropsis* sp. biomass did not hamper the growth performance of juvenile European sea bass. Other studies considering different dietary inclusion of *N. oceanica* indicate that moderate inclusion levels (<15 g/kg diet) do not affect growth and feed performance in other fish species like spotted wolffish (*Anarhichas minorhas*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Sørensen et al. 2017; Knutsen et al. 2019). On the contrary, higher dietary inclusion levels of *Nannochloropsis* sp. biomass hampered growth and feed conversion in Nile

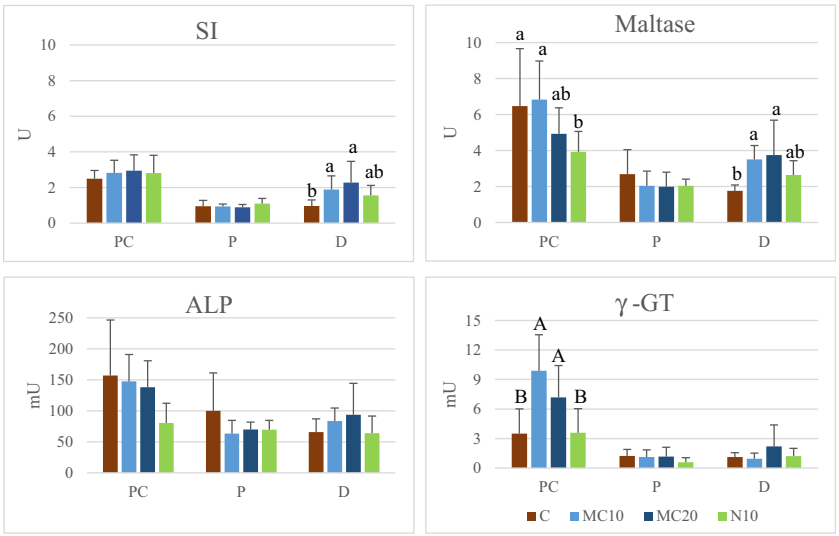


Fig. 4 Specific activity of SI (sucrase-isomaltase), maltase, ALP (alkaline phosphatase), and γ-GT (gamma glutamil transpeptidase) in PC (pyloric caeca), P (proximal intestine), and D (distal intestine) of European sea bass fed the experimental diets over 75 days. Data are presented as means ± SD (n=3). Different letters indicate significant differences among the treatment diets (lower case superscript P < 0.05, capital superscript P < 0.001).

tilapia (Abdelghany et al. 2020) and Atlantic salmon (Sørensen et al. 2017; Teuling et al. 2018).

The nutritional value of a feed depends not only on its nutrient content but also on the animal's ability to digest and absorb it. Consequently, the evaluation of the nutrient digestibility is the first step to determine the feasibility of using a microalgae product in aquafeeds (Allan et al. 2000; Tibbetts et al. 2006; Guedes and Malcata 2012; Cardinaletti et al. 2018). The effects of the dietary utilization of a microalgae consortium on zootechnical fish performance observed in the present study are similar to those of other studies where the dietary inclusion of microalgae biomass resulted in a marked reduction in nutrient and energy digestibility independently of the microalgae species studied, i.e., *T. suecica* (Tulli et al. 2012; Vizcaíno et al. 2016b), *Isochrysis galbana* (Tibaldi et al. 2015), *Phaeodactylum tricornutum* (Sørensen et al. 2016), and a blend of *Tetraselmis suecica* and *Tisochrysis lutea* (Cardinaletti et al. 2018). In the present study, the replacement of terrestrial plant source by 10% *Nannochloropsis* spp. did not significantly affect the nutrient and energy ADCs in European sea bass. The ADC values mirrored the data recently reported for defatted *Nannochloropsis* sp. in European sea bass (Valente et al. 2019), where dry matter, protein, lipid, and energy ADC figures were 79.9%, 94.2%, 97.1%, and 88% respectively when included at 10% of the diet in fish meal replacement. Similar data were observed by De Cruz et al. (2018) when a moderate (6%) dietary inclusion of *N. salina* did not significantly modify the protein ADC in comparison with a fish meal and fish oil-based diet in *Morone* sp., with a figure close to the one observed in the present experiment for MC10 (88.4% vs 90.0%). On the contrary, in post-smolts (215 g) Atlantic salmon, a 10% dietary inclusion of defatted *Nannochloropsis* sp. resulted in a significant decrease of dry matter (71.6% vs 76%), protein (85% vs 87.9%), lipid (88.6% vs 92.6%), and energy (81.5% vs 85.9%) ADCs as compared to a fish meal-based diet (Sørensen et al. 2017). Higher dietary inclusion levels (30%) also resulted in a significant decrease of nutrient and energy digestibility in comparison with the values reported for Atlantic salmon (67.3% for dry matter, 82.2% for protein, and 77.4% for energy ADCs, respectively) (Gong et al. 2018).

One of the parameters affecting dietary digestibility is the processing technology adopted to obtain the microalgae-based ingredient (Batista et al. 2020b). The microalgae cell wall is hard to digest and can limit the bioavailability of intracellular nutrients. A recent study carried out by Teuling et al. (2018) shows that cell wall disruption increases the bioavailability of *N. gaditana* biomass in the diet for Nile tilapia juvenile. The substantial inclusion of disrupted microalgae biomass (30%) resulted in an increase in protein and lipid ADCs from 62 to 78% and from 50 to 82%, respectively. Similar results were also observed by Tulli et al. (2017) with *Chlorella sorokiniana* dry biomass included in the diet for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Low nutrient digestibility has also been associated with intestinal morphological alterations such as reduction in the intestinal absorption area (Silva et al. 2015; Araújo et al. 2016; Moutinho et al. 2018), but the results of the present study do not support such conclusion as villus length and width remained similar among dietary treatments. Nevertheless, the inclusion of the microalgae consortium resulted in a significant decrease in the number of total acid goblet cells at the end of the feeding trial, suggesting lower intestinal protection against bacterial translocation (Torrecillas et al. 2019). Increased neutral GC was recently associated with higher protein and energy ADC values in European sea bass fed with *N. oceanica* (Batista et al. 2020a), but this could not be observed in the present study. In addition, the intestinal structure and enzyme activities are determinant in nutrient absorption and provide a physical barrier against pathogenic microorganisms. Thus, this aspect merits further consideration even though the dietary treatments did not hamper gut functionality, herein considered a general framework of animal physiological welfare. Maltase and sucrase-isomaltase are disaccharidases belonging to hydrolases, which split the disaccharides into glucose and glucose and fructose, respectively. The activity of both disaccharidases in the terminal phase of the digestion of the carbohydrates was higher in pyloric caeca than in proximal and distal intestine. According to previous studies (Krogdahl et al. 1999; Harpaz et al. 2005; Tibaldi et al. 2006; Messina et al. 2019), the data observed in the present study confirm that pyloric caeca are the main site of the final digestion of the carbohydrates. In this part of the gut, only the test diet containing *Nannochloropsis* modulated the maltase activity. On the contrary, the distal part of the intestine seems to be affected by the presence of the algal consortium that stimulates the activity of both disaccharidases. Considering the decreasing amount of starch in the diets MC10 and MC20, it can be assumed that the small amount of starch provided by the consortium becomes available only in this tract of the intestine. γ-GT plays an essential role in the final digestion and absorption of proteins and is one of the main enzymes located in intestinal microvilli. γ-GT reached the highest activity in the PCs as also reported by Harpaz et al. (2005), who studied the response of Asian seabass *Latex calcarifer*, featuring a size similar to our experimental fish, to different feeding levels. On the contrary, Messina et al. (2019) and Tibaldi et al. (2006) for European sea bass and Harpaz and Uni (1999) for several fish species found that the distal intestine revealed the highest activity of γ-GT. It has to be highlighted that the size of the fish considered by these authors is much larger than that of the European sea bass considered in the present trial and that this specific feature could be related to differences in the enzymatic activity. The effect of MC10 and MC20 diets on the activity of γ-GT in the PC tract could be a consequence of the dietary protein quality, which also affected the protein digestibility. Alkaline

phosphatase is an enzyme of the mature epithelial gut cells and is considered a marker of intestinal integrity. In the present study, the dietary inclusion of the consortium or *Nannochloropsis* biomass did not significantly affect the activity of ALP, indicating that microalgae did not cause major functional changes in gut integrity of European sea bass juveniles, as previously reported by Batista et al. (2020b) and Messina et al. (2019) for adult European sea bass and Vizcaíno et al. (2018) for sole. On the contrary, a previous study by Vizcaíno et al. (2014) showed that the inclusion of *Scenedesmus almeriensis* in the diet of gilthead seabream juveniles resulted in a quadratic response of ALP activity to increasing supplementation of algal biomass.

Conclusion

This is so far the first study aimed at evaluating the dietary utilization of multispecific marine microalgae consortium biomass originated from a HRAP for a commercially relevant species. The results support a possible substitution of up to 10% of terrestrial vegetable ingredients by the microalgae consortium dried biomass with a significant increase of European sea bass final body weight, though impairing nutrient and energy digestibility. *Nannochloropsis* sp. biomass also has the potential to partially substitute terrestrial plant ingredient up to 10% of the diet without affecting growth performance, dietary nutrient utilization, and gut enzymatic activities. Algal consortium and *Nannochloropsis* sp. biomass could undergo specific processing techniques before being included in fish feed formulation to improve nutrient bioavailability. To increase aquaculture sustainability, this study using fish farm effluents to produce a multispecific marine non-axenic valuable biomass represents the first attempt to enhance a circular use of natural biomasses aquafeeds. Such an approach still needs further efforts, and the safety issues connected with their utilization need specific evaluations.

Acknowledgements The authors wish to thank Triplet S. of the IFREMER (French Research Institute for Exploitation of the Sea, Laboratoire Service d'Expérimentations Aquacoles, Palavas-les-flots) for the technical assistance and the microalgae culture.

Availability of data and materials All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Author contribution CP and GD provided the microalgae consortium and controlled the sea bass rearing plant. MM, BO, LP, and GP performed the laboratory examinations. FT performed the analysis of the data and supervised the project. LMPV provided the funding. GP, MM, and FT wrote the original draft. All the authors reviewed and approved the final manuscript.

Funding Open access funding provided by Università degli Studi di Udine within the CRUI-CARE Agreement. The study was supported by ERA-NET COFASP/004/2015 Project "MARINALGAE4AQUA - Improving bio-utilization of marine algae as sustainable feed ingredients to increase efficiency and quality of aquaculture production" and by FCT — Foundation for Science and Technology to CIIMAR (UIDB/04423/2020, UIDP/04423/2020).

Declarations

Ethics approval and consent to participate The handling procedures and sampling methods involving fish were in accordance with the guidelines of the European Union Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes (Ethical authorisation: APAFIS#l 2871-2018091215242876).

Consent for publication Not applicable

Competing interests The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

References

Abdelghany MF, El-Sawy HB, Abd El-hameed SAA, Khames MK, Abdel-Latif HMR, Naiel MAE (2020) Effects of dietary *Nannochloropsis oculata* on growth performance, serum biochemical parameters, immune responses, and resistance against *Aeromonas veronii* challenge in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish Shellfish Immunol 107:277–288. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.10.015

Allan GL, Parkinson S, Booth MA, Stone DAJ, Rowland SJ, Frances J, Warner-Smith R (2000) Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients. Aquaculture 186:293–310. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00380-4

Andreotti V, Chindris A, Brundu G, Vallainc D, Francavilla M, García J (2017) Bioremediation of aquaculture wastewater from *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) with different microalgae species. Chem Ecol 33:750–761. https://doi.org/10.1080/02757540.2017.1378351

Anitha S, Shah AR, Ali BMJ (2018) Modulation of lipid productivity under nitrogen, salinity and temperature stress in microalgae *Dunaliella* sp. J Environ Biol 39:625–632. https://doi.org/10.22438/jeb/39/5/MRN-761

Anthony R, Stuart B (2015) Solvent extraction and characterization of neutral lipids in *Oocystis* sp. Front Energy Res 3:64. https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00064

Apandi NM, Radin MSRM, Al-Gheethi A, Kassim AHM (2019) Microalgal biomass production through phycoremediation of fresh market wastewater and potential applications as aquaculture feeds.

Environ Sci Pollut Res 26:3226–3242. https://doi.org/10.1007/s11356-018-3937-3

Araújo M, Rema P, Sousa-Pinto I, Cunha LM, Peixoto MJ, Pires MA, Seixas F, Brotas V, Beltrán C, Valente LMP (2016) Dietary inclusion of IMTA-cultivated *Gracilaria vermiculophylla* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: effects on growth, intestinal morphology, tissue pigmentation, and immunological response. J Appl Phycol 28:679–689. https://doi.org/10.1007/s10811-015-0591-8

Atiku H, Mohamed RMSR, Al-Gheethi AA, Wurochekke AA, Kassim AHM (2016) Harvesting of microalgae biomass from the phycoremediation process of greywater. Environ Sci Pollut Res 23:24624–24641. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7456-9

Awaiss A, Kestemont P, Micha J-C (1992) Nutritional suitability of the rotifer, *Brachionus calyciflorus* Pallas for rearing freshwater fish larvae. J Appl Ichthyol 8:263–270. https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1992.tb00693.x

Badr OAM, El-Shawaf IIS, El-Garhy HAS, Moustafa MMA, Ahmed-Farid OA (2019) Antioxidant activity and phycoremediation ability of four cyanobacterial isolates obtained from a stressed aquatic system. Mol Phylogenet Evol 134:300–310. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.01.018

Bahr M, Díaz I, Dominguez A, González Sánchez A, Muñoz R (2013) Microalgal-Biotechnology As a Platform for an Integral Biogas Upgrading and Nutrient Removal from Anaerobic Effluents. Environ Sci & Technol 48 (1):573–581

Barrut B, Blancheton JP, Champagne JY, Grasmick A (2012) Water delivery capacity of a vacuum airlift - application to water recycling in aquaculture systems. Aquac Eng 48:31–39. https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2011.12.010

Barrut B, Blancheton JP, Muller-Feuga A, René F, Narváez C, Champagne JY, Grasmick A (2013) Separation efficiency of a vacuum gas lift for microalgae harvesting. Bioresour Technol 128:235–240. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.056

Batista S, Pereira R, Oliveira B, Baião LF, Jessen F, Tulli F, Messina M, Silva JL, Abreu H, Valente LMP (2020a) Exploring the potential of seaweed *Gracilaria gracilis* and microalga *Nannochloropsis oceanica*, single or blended, as natural dietary ingredients for European seabass *Dicentrarchus labrax*. J Appl Phycol 32:2041–2059. https://doi.org/10.1007/s10811-020-02118-z

Batista S, Pintado M, Marques A, Abreu H, Silva JL, Jessen F, Tulli F, Valente LMP (2020b) Use of technological processing of seaweed and microalgae as strategy to improve their apparent digestibility coefficients in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. J Appl Phycol 32:3429–3446. https://doi.org/10.1007/s10811-020-02185-2

Becker EW (2007) Micro-algae as a source of protein. Biotechnol Adv 25:207–210. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002

Bleakley S, Hayes M (2017) Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production. Foods 6(5):33. https://doi.org/10.3390/foods6050033

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248–254

Cardinaletti G, Messina M, Bruno M, Tulli F, Poli B, Giorgi G, Chini-Zittelli G, Tredici M, Tibaldi E (2018) Effects of graded levels of a blend of *Tisochrysis lutea* and *Tetraselmis suecica* dried biomass on growth and muscle tissue composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets low in fish meal and oil. Aquaculture 485:173–182. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.049

Carignan J, Hild P, Mevelle G, Morel J, Yeghicheyan D (2001) Routine analyses of trace elements in geological samples using flow injection and low pressure on-line liquid chromatography coupled to ICP-MS: a study of geochemical reference materials BR, DR-N, UB-N, AN-G and GH. Geostand Geoanal Res 25:187–198

Castro C, Coutinho F, Iglesias P, Oliva-Teles A, Couto A (2020) *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp. inclusion in plant-based diets modulate the intestine and liver antioxidant mechanisms of European sea bass juveniles. Front Vet Sci 7:607575. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.607575

Cho CY, Slinger SJ, Bayley HS (1982) Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity. Comp Biochem Physiol B 73:25–41. https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90198-5

Chu W-L (2012) Biotechnological applications of microalgae. Int e-J Sci Med Educ 6:S24–S37

Coronado-Apodaca KG, Vital-Jácome M, Buitrón G, Quijano G (2019) A step-forward in the characterization of microalgal consortia: microbiological and kinetic aspects. Biochem Eng J 145:170–176. https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.02.021

Craggs R, Park J, Heubeck S, Sutherland D (2014) High rate algal pond systems for low-energy wastewater treatment, nutrient recovery and energy production. N Z J Bot 52:60–73. https://doi.org/10.1080/0028825X.2013.861855

Dallaire V, Lessard P, Vandenberg G, De La Noüe J (2007) Effect of algal incorporation on growth, survival and carcass composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. Bioresour Technol 98:1433–1439. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.043

De Cruz CR, Lubrano A, Gatlin DM III (2018) Evaluation of microalgae concentrates as partial fishmeal replacements for hybrid striped bass *Morone* sp. Aquaculture 493:130–136. https://doi.org/10.1016/J.aquaculture.2018.04.060

Eryalçın KM, Yıldız M (2015) Effects of long-term feeding with dried microalgae added microdiets on growth and fatty acid composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., 1758). Turk J Fish Aquat Sci 15:899–909. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v15_4_14

FAO (2018) The state of world fisheries and agriculture 2018 - meeting the sustainable development goals. www.fao.org/publications.

Galès A, Triplet S, Geoffroy T, Roques C, Carré C, Le Floc'H E, Lanfranchi M, Simier M, Roque D'Orbcastel E, Przybyla C, Fouilland E (2020) Control of the pH for marine microalgae polycultures: a key point for CO_2 fixation improvement in intensive cultures. J CO2 Util 38:187–193. https://doi.org/10.1016/j.jcou.2020.01.019

Gbadamosi OK, Lupatsch I (2018) Effects of dietary *Nannochloropsis salina* on the nutritional performance and fatty acid profile of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Algal Res 33:48–54. https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.04.030

Gong Y, Guterres HADS, Huntley M, Sørensen M, Kiron V (2018) Digestibility of the defatted microalgae *Nannochloropsis* sp. and *Desmodesmus* sp. when fed to Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquac Nutr 24:56–64. https://doi.org/10.1111/anu.12533

Guedes C, Malcata X (2012) Nutritional value and uses of microalgae in aquaculture. In: Aquaculture, pp 59–78. https://doi.org/10.5772/30576

Haas S, Bauer JL, Adakli A, Meyer S, Lippemeier S, Schwarz K, Schulz C (2016) Marine microalgae *Pavlova viridis* and *Nannochloropsis* sp. as n-3 PUFA source in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). J Appl Phycol 28:1011–1021. https://doi.org/10.1007/s10811-015-0622-5

Harpaz S, Hakim Y, Slosman T, Eroldoğan OT (2005) Effects of adding salt to the diet of Asian sea bass *Lates calcarifer* reared in fresh or salt water recirculating tanks, on growth and brush border enzyme activity. Aquaculture 248:315–324. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.007

Harpaz S, Uni Z (1999) Activity of intestinal mucosal brush border membrane enzymes in relation to the feeding habits of three aquaculture fish species. Comp Biochem Physiol Part A 124:155–160. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00106-3

Hibberd DJ (1981) Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). Bot J Linnean Soc 82 (2):93–119

Hussein EE-S, Dabrowski K, El-Saidy DMSD, Lee B-J (2013) Enhancing the growth of Nile tilapia larvae/juveniles by replacing plant (gluten) protein with algae protein. Aquac Res 44:937–949. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03100.x

Katayama T, Nagao N, Kasan NA, Khatoon H, Rahman NA, Takahashi K, Furuya K, Yamada Y, Wahid MEA, Jusoh M (2020) Bioprospecting of indigenous marine microalgae with ammonium tolerance from aquaculture ponds for microalgae cultivation with ammonium-rich wastewaters. J Biotechnol 323:113–120. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.08.001

Kissinger KR, García-Ortega A, Trushenski JT (2016) Partial fish meal replacement by soy protein concentrate, squid and algal meals in low fish-oil diets containing *Schizochytrium limacinum* for longfin yellowtail *Seriola rivoliana*. Aquaculture 452:37–44. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.022

Kliphuis AMJ, Klok AJ, Martens DE, Lamers PP, Janssen M, Wijffels RH (2012) Metabolic modeling of *Chlamydomonas reinhardtii*: energy requirements for photoautotrophic growth and maintenance. J Appl Phycol 24:253–266. https://doi.org/10.1007/s10811-011-9674-3

Knutsen HR, Johnsen IH, Keizer S, Sørensen M, Roques JAC, Hedén I, Sundell K, Hagen Ø (2019) Fish welfare, fast muscle cellularity, fatty acid and body-composition of juvenile spotted wolffish (*Anarhichas minor*) fed a combination of plant proteins and microalgae (*Nannochloropsis oceanica*). Aquaculture 506:212–223. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.043

Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD (2013) Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. Appl Environ Microbiol 79:5112–5120. https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13

Krogdahl Å, Nordrum S, Sorensen M, Brudeseth L, Rosjo C (1999) Effects of diet composition on apparent nutrient absorption along the intestinal tract and of subsequent fasting on mucosal disaccharidase activities and plasma nutrient concentration in Atlantic salmon *Salmo salar* L. Aquac Nutr 5:121–133. https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1999.00095.x

Lorenzen CJ (1967) Determination of chlorophyll and pheo-pigments: spectrophotometric equations. Limnol Oceanogr 12:343–346. https://doi.org/10.4319/lo.1967.12.2.0343

Lozano-Muñoz I, Muñoz S, Díaz NF, Medina A, Bazaes J, Riquelme C (2020) Nutritional enhancement of farmed salmon meat via non-GMO *Nannochloropsis gaditana*: eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3), docosapentaenoic acid (DPA, 22:5 n-3) and vitamin D3 for human health. Molecules 25:4615. https://doi.org/10.3390/molecules25204615

Maizatul AY, Radin Mohamed RMS, Al-Gheethi AA, Hashim MKA (2017) An overview of the utilisation of microalgae biomass derived from nutrient recycling of wet market wastewater and slaughterhouse wastewater. Int Aquat Res 9:177–193

Markou G, Depraetere O, Muylaert K (2016) Effect of ammonia on the photosynthetic activity of *Arthrospira* and *Chlorella*: a study on chlorophyll fluorescence and electron transport. Algal Res 16:449–457. https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.039

Messina M, Bulfon C, Beraldo P, Tibaldi E, Cardinaletti G (2019) Intestinal morpho-physiology and innate immune status of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in response to diets including a blend of two marine microalgae, *Tisochrysis lutea* and *Tetraselmis suecica*. Aquaculture 500:660–669. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.054

Michelon W, Da Silva MLB, Matthiensen A, De Andrade CJ, De Andrade LM, Soares HM (2021) Amino acids, fatty acids, and peptides in microalgae biomass harvested from phycoremediation of swine wastewaters. Biomass Convers Bior:1–12. https://doi.org/10.1007/s13399-020-01263-2

Michels MH, Vaskoska M, Vermu MH, Wijffels RH (2014) Growth of *Tetraselmis suecica* in a tubular photobioreactor on wastewater from a fish farm. Water Res 65:290–296. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.017

Moutinho S, Linares F, Rodríguez JL, Sousa V, Valente LMP (2018) Inclusion of 10% seaweed meal in diets for juvenile and on-growing life stages of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). J Appl Phycol 30:3589–3601. https://doi.org/10.1007/s10811-018-1482-6

Nasir NM, Syuhada N, Bakar A, Lananan F, Hajar S, Hamid A, Lam SS, Jusoh A (2015) Treatment of African catfish, *Clarias gariepinus* wastewater utilizing phytoremediation of microalgae, *Chlorella* sp. with *Aspergillus niger* bio-harvesting Co-cultivation Optimum dosage from phytoremediation N and P discharged in effluent N and P out with fish production N and P input with feed and water inflow. Bioresour Technol 190:492–498. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.023

Oliveira CYB, Nader C, Silva MFO, Fracalossi DM, Gálvez AO, Lopes RG, Derner RB (2020) Integrated use of microalgal biomass of *Choricystis minor* var. minor: a promising model for production of biodiesel and aquafeeds. Biomass Convers Bior:1–9. https://doi.org/10.1007/s13399-020-01091-4

Olsen Y (2011) Resources for fish feed in future mariculture. Aquac Environ Interact 1:187–200. https://doi.org/10.3354/aei00019

Peres H, Oliva-Teles A (1999a) Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization by European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 179:325–334

Peres H, Oliva-Teles A (1999b) Influence of temperature on protein utilization in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 170:337–348

Priyadarshani I, Rath B (2012) Commercial and industrial applications of micro algae-a review. J Algal Biomass Utln 3:89–100

Quijano G, Arcila JS, Buitrón G (2017) Microalgal-bacterial aggregates: applications and perspectives for wastewater treatment. Biotechnol Adv 35:772–781. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.07.003

Raskin L, Smith RD, Salt DE (1997) Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. Curr Opin Biotechnol 8:221–226

Rawat I, Ranjith Kumar R, Mutanda T, Bux F (2011) Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. Appl Energy 88:3411–3424. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025

Riaño B, Blanco S, Becares E, García-González MC (2016) Bioremediation and biomass harvesting of anaerobic digested cheese whey in microalgal-based systems for lipid production. Ecol Eng 97:40–45. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.08.002

Ruiz-Martinez A, Martin Garcia N, Romero I, Seco A, Ferrer J (2012) Microalgae cultivation in wastewater: nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. Bioresour Technol 126:247–253. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.022

Sarker PK, Kapuscinski AR, Vandenberg GW, Proulx E, Sitek AJ (2020) Towards sustainable and ocean-friendly aquafeeds: evaluating a fish-free feed for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using three marine microalgae species. Elem Sci Anthr 8:5. https://doi.org/10.1525/elementa.404

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol 75:7537–7541. https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09

Shah MR, Lutzu GA, Alam A, Sarker P, Chowdhury MAK, Parsaeimehr A, Liang Y, Daroch M (2018) Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. J Appl Phycol 30:197–213. https://doi.org/10.1007/s10811-017-1234-z

Sheikhzadeh N, Tayefi-Nasrabadi H, Khani Oushani A, Najafi Enferadi MH (2012) Effects of *Haematococcus pluvialis* supplementation on antioxidant system and metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiol Biochem 38:413–419. https://doi.org/10.1007/s10695-011-9519-7

Silva DM, Valente LMP, Sousa-Pinto I, Pereira R, Pires MA, Seixas F, Rema P (2015) Evaluation of IMTA-produced seaweeds (*Gracilaria*, *Porphyra*, and *Ulva*) as dietary ingredients in Nile

tilapia, *Oreochromis niloticus* L., juveniles. Effects on growth performance and gut histology. J Appl Phycol 27:1671–1680. https://doi.org/10.1007/s10811-014-0453-9

Sirakov I, Velichkova K, Stoyanova S, Staykov Y (2015) The importance of microalgae for aquaculture industry. Review. Int J Fish Aquat Stud 2:81–84

Śliwińska-Wilczewska S, Latała A (2018) Allelopathic activity of the bloom-forming picocyanobacterium *Synechococcus* sp. on the coexisting microalgae: the role of eutrophication. Int Rev Hydrobiol 103:37–47. https://doi.org/10.1002/iroh.201801940

Sørensen M, Berge GM, Reitan KI, Ruyter B (2016) Microalga *Phaeodactylum tricornutum* in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*) —effect on nutrient digestibility, growth and utilization of feed. Aquaculture 460:116–123. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.010

Sørensen M, Gong Y, Bjarnason F, Vasanth GK, Dahle D, Huntley M, Kiron V (2017) *Nannochloropsis oceania*-derived defatted meal as an alternative to fishmeal in Atlantic salmon feeds. PLoS One 12(7): e0179907. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179907

Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A (2006) Commercial applications of microalgae. J Biosci Bioeng 101:87–96. https://doi.org/10.1263/JBB.101.87

Strom LS, Morello TA (1998) Comparative growth rates and yields of ciliates and heterotrophic dinoflagellates. J Plankt Res 20(3):571–584

Teuling E, Wierenga PA, Agboola JO, Gruppen H, Schrama JW (2018) Cell wall disruption increases bioavailability of *Nannochloropsis gaditana* nutrients for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 499:269–282. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.047

Tibaldi E, Hakim Y, Uni Z, Tulli F, De Francesco M, Luzzana U, Harpaz S (2006) Effects of the partial substitution of dietary fish meal by differently processed soybean meals on growth performance, nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 261: 182–193. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.026

Tibaldi E, Zittelli GC, Parisi G, Bruno M, Giorgi G, Tulli F, Venturini S, Tredici MR, Poli BM (2015) Growth performance and quality traits of European sea bass (*D. labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried Isochrysis sp. (T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. Aquaculture 440:60–68. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.002

Tibbetts SM, Milley JE, Lall SP (2006) Apparent protein and energy digestibility of common and alternative feed ingredients by Atlantic cod, *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758). Aquaculture 261: 1314–1327. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.052

Topic Popovic N, Strunjak-Perovic I, Coz-Rakovac R, Barisic J, Jadan M, Persin Berakovic A, Sauerborn Klobucar R (2012) Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. J Appl Ichthyol 28:553–564. https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2012.01950.x

Torrecillas S, Terova G, Makol A, Serradell A, Valdenegro V, Gini E, Izquierdo M, Acosta F, Montero D (2019) Dietary phytogenics and galactomannan oligosaccharides in low fish meal and fish oil-based diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: effects on gut health and implications on in vivo gut bacterial translocation. PLoS One 14:e0222063. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222063

Tulli F, Messina M, Calligaris M, Tibaldi E (2010) Response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to graded levels of methionine (total sulfur amino acids) in soya protein-based semi-purified diets. Br J Nutr 104:664–673. https://doi.org/10.1017/S0007114510001029

Tulli F, Pascon G, Niccolai A, Chini Zittelli G, Tredici M, Valente L, Tibaldi E (2017) Effect of sonication on the nutrient digestibility of *Chlorella Sorokiniana* in Rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*). Proceedings European Aquaculture Society Congress October 20-23 2017, Dubrovnik (CK)

Tulli F, Zittelli C, Poli BM, Tibaldi E (2012) Effect of the inclusion of dried *Tetraselmis suecica* on growth, feed utilization, and fillet composition of European sea bass juveniles fed organic diets. J Aquat Food Prod Technol 21:1–11. https://doi.org/10.1080/10498850.2012.664803

Valente LMP, Custódio M, Batista S, Fernandes H, Kiron V (2019) Defatted microalgae (*Nannochloropsis* sp.) from biorefinery as a potential feed protein source to replace fishmeal in European sea bass diets. Fish Physiol Biochem 45:1067–1081. https://doi.org/10.1007/s10695-019-00621-w

Velichkova KN, Sirakov I, Stoyanova S (2014) Biomass production and wastewater treatment from aquaculture with *Chlorella vulgaris* under different carbon sources. Sci Bull Ser F Biotechnol 18:83–88

Vignet C, Le Menach K, Lyphout L, Guionnet T, Frère L, Leguay D, Budzinski H, Cousin X, Bégout ML (2014) Chronic dietary exposure to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs causes physiological disruption in zebrafish-part II: behavior. Environ Sci Pollut Res 21:13818–13832. https://doi.org/10.1007/s11356-014-2762-6

Vizcaíno AJ, López G, Sáez MI, Jiménez JA, Barros A, Hidalgo L, Camacho-Rodríguez J, Martínez TF, Cerón-García MC, Alarcón FJ (2014) Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. Aquaculture 431:34–43. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.010

Vizcaíno AJ, Mendes SI, Varela JL, Ruiz-Jarabo I, Rico R, Figueroa FL, Abdala R, Moriñigo MÁ, Mancera JM, Alarcón FJ (2016a) Growth, tissue metabolites and digestive functionality in *Sparus aurata* juveniles fed different levels of macroalgae, *Gracilaria cornea* and *Ulva rigida*. Aquac Res 47:3224–3238. https://doi.org/10.1111/are.12774

Vizcaíno AJ, Rodiles A, López G, Sáez MI, Herrera M, Hachero I, Martínez TF, Cerón-García MC, Alarcón FJ (2018) Growth performance, body composition, and digestive functionality of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles fed diets including microalgae freeze-dried biomass. Fish Physiol Biochem 44:661–677. https://doi.org/10.1007/s10695-018-0462-8

Vizcaíno AJ, Saéz MI, López G, Arizcun M, Abellán E, Martínez TF, Cerón-García MC, Alarcón FJ (2016b) *Tetraselmis suecica* and *Tisochrysis lutea* meal as dietary ingredients for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fry. J Appl Phycol 28:2843–2855. https://doi.org/10.1007/s10811-016-0845-0

Walker AB, Berlinsky DL (2011) Effect of partial replacement of fish meal protein by microalgae on growth, feed intake and body composition of Atlantic cod. N Am J Aquac 73:76–83

Wang X, Zhang Y, Li C, Huang X, Li F, Wang X, Li G (2020) Allelopathic effect of *Oocystis borgei* culture on *Microcystis aeruginosa*. Environ Technol:1–10. https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1847202

Yaakob Z, Ali E, Zainal A, Mohamad M, Takriff MS (2014) An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. J Biol Res 21:6. https://doi.org/10.1186/2241-5793-21-6

Yen HW, Ho SH, Chen CY, Chang JS (2015) CO_2, NOx and SOx removal from flue gas via microalgae cultivation: a critical review. Biotechnol J 10:829–839. https://doi.org/10.1002/biot.201400707

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

frontiers in Astronomy and Space Sciences

REVIEW
published: 24 June 2021
doi: 10.3389/fspas.2021.699097

Space Aquaculture: Prospects for Raising Aquatic Vertebrates in a Bioregenerative Life-Support System on a Lunar Base

Cyrille Przybyla *

MARBEC, Univ Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD, Palavas-les-Flots, France

The presence of a human community on the Moon or on Mars for long-term residence would require setting up a production unit allowing partial or total food autonomy. One of the major objectives of a bioregenerative life-support system is to provide food sources for crewed missions using *in situ* resources and converting these into the food necessary to sustain life in space. The nutritive quality of aquatic organisms makes them prospective candidates to supplement the nutrients supplied by photosynthetic organisms already studied in the context of space missions. To this end, it is relevant to study the potential of fish to be the first vertebrate reared in the framework of space agriculture. This article investigates the prospects of space aquaculture through an overview of the principal space missions involving fish in low orbit and a detailed presentation of the results to date of the Lunar Hatch program, which is studying the possibility of space aquaculture. A promising avenue is recirculating aquaculture systems and integrated multi-trophic aquaculture, which recycles fish waste to convert it into food. In this sense, the development and application of space aquaculture shares the same objectives with sustainable aquaculture on Earth, and thus could indirectly participate in the preservation of our planet.

Keywords: space exploration, fish, aquaculture, bioregenerative life-support system, European seabass, moon, mars, lunar hatch

OPEN ACCESS

Edited by:
Cyprien Verseux,
University of Bremen, Germany

Reviewed by:
Masahiro Chatani,
Showa University, Japan
Paul B Brown,
Purdue University, United States

***Correspondence:**
Cyrille Przybyla
Cyrille.przybyla@ifremer.fr

Specialty section:
This article was submitted to Astrobiology, a section of the journal Frontiers in Astronomy and Space Sciences

Received: *22 April 2021*
Accepted: *08 June 2021*
Published: *24 June 2021*

Citation:
Przybyla C (2021) Space Aquaculture: Prospects for Raising Aquatic Vertebrates in a Bioregenerative Life-Support System on a Lunar Base. Front. Astron. Space Sci. 8:699097. doi: 10.3389/fspas.2021.699097

INTRODUCTION

Space agencies are currently considering plans to build bases on the Moon or eventually on Mars, establishing a community of *Homo sapiens* outside the Earth for the first time. Such a project places humanity at the dawn of an unprecedented adventure, which will involve subsisting in a hostile environment devoid of a local trophic chain of nourishment. Like most Earth's organisms, *Homo sapiens* is composed predominantly of water. Indeed, water is an essential element for human survival, and its presence on a celestial body is a prerequisite for sustainable settlement there. Beyond this, a balanced nutritional intake (proteins, lipids, and carbohydrates) is necessary for basic needs and daily activity. The provision of essential needs will depend on the population size and the duration of stay, and will also require a technical and economic model that allows the supply of food and water. One promising avenue to respond to this constraint is a bioregenerative life-support system (BLSS), which would allow partial food self-sufficiency by deploying strategies for water recycling, aquaponics, and food-production systems.

Photosynthetic Organisms as Food Sources in a Bioregenerative Life Support System

From the first plants sent into space in 1960 with Sputnik 2 to the current experiments underway at the International Space Station (ISS), the physiological responses of several terrestrial plants under microgravity conditions have been studied for their potential to develop "astrocultures" intended to feed future residents of a space base (Zabel et al., 2016). The environment for cultivation would be different on the Moon (Zeidler et al., 2017) or on Mars (Bamsey et al., 2009; Kiss, 2014) and plant selection and cultivation strategy would have to be adapted for the available local nutrients. A project led by NASA is running experiments on plants in low orbit in a small plant-growth chamber called Veggie carried on the ISS. In 2015, Veggie provided the first lettuce at an edible size entirely produced in real microgravity conditions (Khodadad et al., 2020). The list of candidate plants for cultivation under BLSS conditions includes more than a dozen species: wheat, rice, soybean, peanuts, sweet pepper, carrots, tomatoes, coriander, lettuce, radish, squash, onion, and garlic (Liu et al., 2008; Paradiso et al., 2012; El-Nakhel et al., 2019). These cereals, vegetables, and fruits could provide carbohydrates, phosphorus, pre-vitamin A, vitamins B_1, B_6, B_9, and C; however, the protein and fat provided by vegetal sources are often negligible compared to animal sources.

Aside from terrestrial food candidates, aquatic sources have the capacity to provide nutritional compounds required for balanced health. For example, aquatic cyanobacteria, could be produced in bioreactors to supply biological resources. Cyanobacteria are able to fix carbon dioxide from the exhalation of organisms and transform nitrogen waste from various physiological activities (Baque et al., 2014). These organisms are likely to be easier to cultivate on Mars than on the Moon because of the presence in the Martian atmosphere of carbon dioxide and different forms of nitrogen (Verseux et al., 2016), meaning they would not be dependent on the importation of sources of carbon or carbohydrates to the site as would be the case on the Moon. The most well-known edible photosynthetic cyanobacteria on Earth, *Arthrospira platensis* (formerly known as spirulina), is a credible candidate for cultivation in space. This food source is the subject of study in the framework of the European MELiSSA project consortium (Lasseur et al., 1996; Poughon et al., 2009) to feed astronauts. Moreover, *Arthrospira platensis* could be used as an indirect food source for humans by feeding fish such as trout, tilapia or sturgeon (Olvera-Novoa et al., 1998; Palmegiano et al., 2005; Flores et al., 2012). The nutritional contribution of *Arthrospira platensis* is mainly concentrated in its supply of proteins (Sarma et al., 2008), iron and pigment precursors of vitamin A, and antioxidants (Dartsch, 2008), but it only contains marginal amounts of essential fatty acids (ω 6) and lacks of the polyunsaturated fatty acid ω3.

Microalgal life forms are another potential food source–they are highly diversified and offer a wide range of physiological strategies and proximate composition. To date, a few microalgae strains have been studied in low orbit for experiments in a space environment, including *Sphaerocystis* sp., a Chlorophyceae (polar/permafrost green algae), which spent 530 days on a panel outside the ISS in the BIOMEX experiment, in temperatures ranging from −20°C in the dark to 47.2°C in the light (de Vera et al., 2019). *Chlorella* sp., well described in the scientific literature, is the favored algae species for a space mission. This microalgae, as well as other families of marine and freshwater microalgae, are aquaculture study subjects, in particular for water purification by eliminating dissolved and suspended matter in water (Yang et al., 2019), the fixation and sequestration of carbon dioxide (Guo et al., 2015; Gales et al., 2020), as feed for aquatic invertebrates such as copepods, and also as a food supplement for humans (Hader et al., 2006; Niederwieser et al., 2018; Yang et al., 2019).

Many strains of marine microalgae that can be cultivated in aquaculture offer a complete nutritional contribution of proteins, vitamins and especially PUFA, ω3/ω6 and alpha-linoleic acid (ALA), the precursor of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), which are essential elements for proper body functioning, in particular for heart health, vision and brain function. These essential fatty acids are not produced directly by the human body: ALA, EPA, DHA sources are mainly provided by the ingestion of marine organisms such as microalgae, shellfish or finfish.

Space Aquaculture: A Relevant Source of Complementary Nutrition

Resupplying a base in space from Earth on a weekly basis is neither economically nor technologically feasible (a trip to the Moon takes 4–7 days, and to Mars 5–8 months). A short-term solution is to provide processed and prepackaged space food. However, lyophilized conservation is unstable, especially concerning essential nutrients such as potassium, calcium, vitamin D, and vitamin K, which is involved in muscle and bone maintenance. The micronutrients most sensitive to storage degradation are vitamins A, C, B_1, and B_6 after one year at ambient temperature (Cooper et al., 2017). A possible nutrition strategy for space bases could be to couple local fresh production with supplies brought by cargo spaceships.

Providing fresh, nutritious and safe food is imperative for the success of a manned base on Moon or Mars. Recent studies have shown that food energy needs during a spaceflight are similar to those required on Earth. If energy intake is reduced, the human body is subjected to physiological stress causing cardiovascular deconditioning, bone demineralization, muscle atrophy and immune system deficiency. Moreover, microgravity exposure reduces the nitrogen balance in an astronaut's body. This results in a 30% reduction in protein synthesis (Stein, 2001). A study of previous manned missions in low orbit monitored the crew's physical performance consuming food commonly used in space missions and showed that an increase in carbohydrates (from plants) and a decrease in animal protein and fat can disturb the diet balance (Gretebeck et al., 1994). Ideally, a fresh animal-based food source should be included in the diet of space residents.

Seafood is one of the healthier animal products for human nutrition. Its nutritional merits and protective benefits have been abundantly described over the last century. Like wild fish, aquaculture fish sequester digestible proteins and essential amino acids, lipids, including essential polyunsaturated fatty acids (PUFAs), essential vitamins and minerals in their

TABLE 1 | Micronutrients and human nutritional benefits found in fresh fish (adapted from Tacon et al., 2020).

Nutrient class	Fish nutrients	Human health benefits
Proteins	Amino acids	High digestibility–Muscle repair–Cell, enzyme, hormone composition–Neural and digestive functions
	Taurine	Most abundant amino acid in human brain, muscle, retina–Essential for renal, retinal and cardiac activity
Lipids	Phospholipids	Cell membrane regeneration–Energy source for metabolism–EPA precursor
	EPA/DHA (ω3)	Blood clotting prevention–Artery flexibility–Anti-inflammatory–Cardiovascular disease protection–Macular degeneration protection–Cognitive function–Dementia prevention
Vitamins	A	Vision–Tissue, skin, bones–Cell communication–Heart, lungs, kidneys–cancer prevention
	D	Calcium, phosphorus absorption and regulation–Bone mineralization, osteoporosis shield–Immune function–Anti-inflammatory–Hypertension regulation
	E	Antioxidant–PUFA assimilation–Anti-inflammatory–Immune function–Cancer prevention–Cardiovascular protection
	B (Choline)	Neurotransmitter–Mood, memory–Muscle control–Nervous system–Fatty liver prevention
	B9 (Folic acid)	Cell renewal–Brain maintenance–Cardiovascular protection and cancer prevention - Depression risk protection–Cognitive function
	B12	Red blood formation–Neurological function–DNA synthesis–Cardiovascular protection–Cognitive function
Minerals	Calcium	Bones–Muscle activity–Nerve pulse transmission–Osteoporosis protection–Weight management–Hypertension regulation and cardiovascular protection
	Copper	Blood cells–Immune function–Energy production–Cardiovascular disease protection–Dementia–Muscle function
	Iodine	Thyroid protection from radiation–Protein synthesis–Blood regulation
	Iron	Oxygen transportation in blood–Muscle metabolism–Hormone synthesis
	Magnesium	Enzymatic and metabolic system–Hypertension regulation–Bone development–Heart rhythm–Osteoporosis prevention
	Selenium	Thyroid hormone metabolism–DNA synthesis–Cardiovascular disease prevention
	Zinc	Immune function–DNA synthesis–Macular degeneration protection

muscles. Vitamins are precursors of molecules that are essential coenzymes for enzyme catalysis. When the synthesis of coenzymes is not included in an organism's genetic heritage (this is the case for *Homo sapiens*), their natural synthesis must be achieved by the ingestion of living cells. These cells are provided by a diet of plants or animals. In addition to micronutrients, farmed marine, brackish and freshwater fish can sequester ALA (PUFA precursor), EPA or DHA from their diet (Tocher, 2015). Several aquaculture fish have the physiological capability to produce EPA and DHA (ALA chain elongation) and store these essential compounds (Morais et al., 2015; Gregory et al., 2016). The micronutrients commonly found in fish and their health benefits are presented in **Table 1** (Tacon et al., 2020).

At the beginning of the 1980s, the first study on the possibility of space aquaculture emphasized the shared points between recirculating aquaculture systems (RAS) and BLSS (Hanson, 1983). Yet although aquaculture seems to offer a relevant solution for manned long-term missions (Bluem and Paris, 2003), almost four decades later, no significant innovative solutions have been proposed for space exploration. This may be due to the international strategy of developing low orbit science over the last 30 years with the ISS program, to the detriment of more complex and ambitious projects such as trips to the Moon or Mars involving long-term stays.

Why Raise Aquatic Organisms in Space?

Hydrogen and oxygen are abundant in the Universe, and water molecules are everywhere in the solar system. Sub-glacial liquid water has been detected on many rocky planets such as Mars, Mercury, and Venus (Liu, 2019; McCubbin and Barnes, 2019). There is evidence of the presence of an internal ocean on icy moons such as Enceladus (Cadek et al., 2016) and Europa (Kalousova et al., 2016). Recent research has indicated the presence of water molecules on rocky exoplanets from other solar systems in our galaxy (Olson et al., 2020). Water is the main *in situ* resource required for a planetary mission, both for long-term human settlement or astrobiology considerations; however, most observations have revealed that this water has high mineral content or is close to brine due to geological mineralization (Orosei et al., 2018). It would need to be purified to use as a source for water of drinking quality, yet it could be primarily used for rearing marine organisms such as algae, invertebrates, or fish.

Today, producing protein from farmed animals (poultry, cattle, or sheep) in low gravity does not seem feasible. A large surface area is needed for livestock rearing, which would directly compete with human space, and costly synthetized air reconditioned from precious *in situ* resources such as lunar or planetary water or gas produced by BLSS biotechnology would be reserved for the human residents' artificial atmosphere. Due to their poikilothermic physiology, fish require five to twenty times less energy than mammals, and around three times less oxygen, as well as generate less carbon dioxide emissions, which is an important consideration for BLSS gas exchange management.

Another issue is waste management. With terrestrial animals such as pigs, chickens, goats, or cows, feces collection is not easy to solve. However, in aquatic vertebrate production, all dissolved compounds and particulate matter are sequestered in the water and can be easily treated and removed from the system or converted by another organism.

Lastly, compared to terrestrial farmed animals, aquaculture is commonly viewed as playing a major role in improving global food security on Earth because the feed conversion ratio (FCR: the feed biomass necessary to provide to a farmed organism to obtain a weight increase of 1 kg) for fish is drastically lower than for land vertebrates. The FCR for different aquaculture organisms compared to that of the main farmed land animals is shown in **Figure 1**. Protein and calorie retention from aquaculture production is comparable to livestock production (Fry et al.,

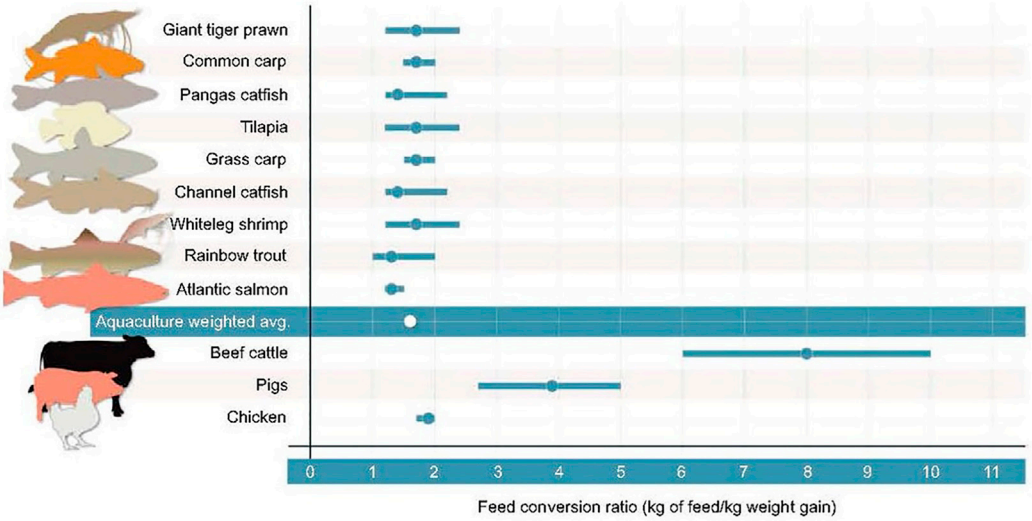


FIGURE 1 | Feed conversion ratios for selected aquaculture species compared to main terrestrial farmed species. Dots represent means and bars indicate the range. Lower values represent higher feed conversion and productivity (from Fry et al., 2018).

2018). All aquatic vertebrates exhibit better feed efficiency, which implies less feed to produce in a BLSS and to manage on the Moon or Mars.

Gas management in lunar or Martian bases will probably be the main challenge for engineers in the next decade. On Earth, the atmosphere sequesters a stock of oxygen, and its continuous production is provided by oceanic and terrestrial photosynthetic organisms. Before the Industrial Revolution, carbon dioxide production was balanced with oxygen consumption. Today, even with the rise in CO_2 emissions, oxygen is not a limited source. In contrast, in a closed system in an extreme environment such as the Moon or Mars, oxygen is not available in its basic form and must be produced. Hence, it is a precious molecule and it is of particular interest to include low oxygen consumers–and consequently, low carbon dioxide producers–in a BLSS. Compared to animals that breathe air, fish, and more generally aquatic organisms, have the lowest oxygen requirement and are the lowest producers of carbon dioxide (**Figure 2**). In fish, carbon dioxide production from respiration is dissolved, concentrated and stored in the water column. Fish have been shown to maintain their oxygen consumption under conditions of elevated CO_2 partial pressure (Ishimatsu et al., 2008). The dissolved CO_2 from RAS effluent could be used directly by an aquatic photosynthetic organism such as algae. Collecting CO_2 emitted from fish and dissolved in the water column and directing it to a secondary biological system without an additive process would be a huge advantage for BLSS gas management.

In contrast to farmed poultry and mammals, aquatic organisms would also be protected from cosmic rays by the water environment, which is an intrinsic radiation shield. The first life forms on Earth developed in a brackish ocean with a salinity of around 10 mg/L (Quinton, 1912). Complex life emerged from the Earth's oceans when the atmospheric layer had not yet been totally formed by the respiration of

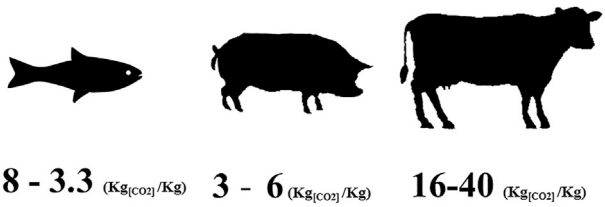


FIGURE 2 | Fish carbon dioxide production (kg produced per kg of biomass) compared with terrestrial animals reared for protein and lipid sources.

microorganisms (stromatolites, bacteria and microalgae) and volcanic activity. The thin atmosphere exposed the Earth's surface to intense cosmic radiation. The hypothesis that water played a role as a radiation shield in the appearance of aquatic life is strong and plausible. In connection with the development of space aquaculture, further experiments would be needed to determine the integrity or splitting of a heavy charged particle from cosmic radiation entering the water of an aquaculture tank.

Transporting any type of animal in a space mission would subject them for several minutes to hypergravity between 4 and 8 g (unit of acceleration due to gravity) depending on the space engine. But hypergravity conditions are not unknown for oceanic fish such as the bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). In one stress experiment, the force required for maximal acceleration was measured in this species. The associated hypergravity applied to the tuna was around 3 g for a few seconds (Dubois et al., 1976). No experiments have been conducted on aquaculture fish, but the natural acceleration caused by an escape behavior has been recorded as between 1 and 3 g.

Another argument in favor of finfish as candidates for space aquaculture is that as opposed to other reared vertebrates and

humans, in the water column they can move vertically as well as horizontally. Fish use a ballast system, the swim bladder, and otolith sensitivity to move in a volume of water, experiencing gravity but also buoyancy. In the ocean, fish are already in microgravity conditions due to water density and Archimedes' principle. Thus, altered gravity should not interfere with swimming behavior during the lifecycle of a fish. Experiments have revealed that a fish in microgravity during a space mission orients its swimming direction and body position according to the position of the light in the module without losing the ability to feed or affecting social behavior. Fish movement can also be correlated with spaceship rotation (Ibsch et al., 2000; Anken et al., 2002).

Indeed, astronauts train underwater as this is the best way to imitate the weightless conditions found in space. The suits they wear in the training pool are designed to provide neutral buoyancy (like a fish's swim bladder) to simulate the microgravity experienced during spaceflight (Otto F.Trout, 1969). Spaceflight analog missions are conducted underwater in NASA's Extreme Environment Mission Operations (NEEMO), involving multi-hour activities at a depth of 19 m (Koutnik et al., 2021). While the hypothesis that the variation in space gravity will not drastically disturb the fish from a physical, behavioral or welfare point of view is plausible, this remains to be tested in experiments on aquaculture fish species.

Ornamental Fish as a Model for Understanding Human Physiology in Space

The zebrafish *Danio*, the medaka *Oryzias*, and the swordtail fish *Xiphophorus* have been frequently boarded on space missions as models for understanding human gravitational sensations, due to the homology with human morphological and physiological systems. These species have proved the most suited vertebrate animals for basic gravity research. The gravity-sensing system in vertebrates from fish to humans has the same basic structure. Although aquarium fish are not aquaculture fish, space missions over the last five decades have provided useful results on fish physiology, behavior and well-being in microgravity (Lychakov, 2016).

The earliest spaceflight with fish occurred on July 28, 1973. Two fingerlings and fifty embryonated eggs of the mummichog (*Fundulus heteroclitus*) were launched by a Saturn 1B rocket. The Apollo service module joined Skylab 3 and the fish were positioned in a plastic bag filled with seawater. This American space mission preferred the mummichog, a small saltmarsh killifish, to goldfish for this experiment. This species was not well known or described at that time, but it became the first "fishonaut". For three days, swimming in loops and circles was observed for the two fingerlings, but they gradually returned to normal swimming. The fish acclimation period was comparable to that for a human crew during a first spaceflight. This observation suggested that the vestibular function (the otolith for fish–the inner ear for humans) probably plays the same sensory role in microgravity. The *Fundulus heteroclitus* eggs carried aboard the Skylab station in low orbit hatched successfully during the mission with a very good hatching rate (96%). The hatched fry displayed normal swimming behavior in contrast to the first hours in microgravity for the fingerlings (Baumgarten, 1975). Fish embryos in microgravity develop a physiological strategy to compensate for the unusual environment, and the larvae formed were already adapted to microgravity, as evidenced by the lack of looping behavior.

In 1975, during nine days of the manned Apollo-Soyuz MA-161 mission, a group of 21-day-old juvenile mummichogs were exposed to real microgravity, and similar irregular swimming was observed. Fish eggs were also boarded (n = 100/samples at 32 hpf [hours post-fertilization], 66 hpf, and 128 hpf stages; pre-liftoff fertilization times) and were subjected to post-flight hatching rate evaluation back on Earth. The juveniles were evaluated using light orientation tests, and no significant differences were observed in behavior, suggesting an adaption capability to the space environment. The embryo hatching rate was 75%, and hatching date monitoring showed that the three earliest stages of egg batches carried on Apollo-Soyuz hatched at 15 days (normal hatching rate is 21 days), much sooner than the latest stage batch and earlier than the control batches at 1 g. Apparently, the development of young eggs was faster under microgravity, but the embryos exhibited no abnormalities resulting from development in a zero-gravity environment. The eyes, heart, nerves, and bones were found to be the same in the flight group as in the control group. There was no evidence of calcium deficiency, except in the shorter hatching-time group (Hoffman et al., 1977).

In July 1994, the 17th Columbia space shuttle mission STS-65 boarded Japanese medaka (*Oryzia latipes*) for 15 days of spaceflight in the second International Microgravity Laboratory (IML-2). These ornamental fish laid eggs, and normal hatching was observed in space, with the results showing that medaka fertilization and embryonic development was not significantly impaired by altered gravity (Ijiri, 1998).

Probably the most impressive aquatic closed-loop experiment in low orbit and a successful demonstration of an aquatic trophic chain in space, in the 1990s, a German team from Ruhr University Bochum and the German Aerospace Centre (DLR) developed the Closed Equilibrated Biological Aquatic System (CEBAS) with fresh water, containing small aquarium fish (*Xiphophorus hellerii*), water snails (*Biomphalaria glabata*), aquatic plants (*Ceratophyllum dermersum*), and aquatic microorganisms. The ground-based demonstration showed that a filter system was able to keep a closed artificial aquatic ecosystem stable for several months and to eliminate waste products deriving from degraded dead fish without a decrease in oxygen concentration to less than 3.5 mg/I at 25°C (Blum et al., 1994; Blum et al., 1995). Then in January 1998, during the Endeavour space shuttle mission STS-89 to the MIR station, aquarium swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) were exposed to 9 days of microgravity, with 200 juveniles and four pregnant adult fish carried in a mini CEBAS module (10 L) (Blum et al., 1994). The aim of this aquatic mini-module (**Figure 3**) was to record the behavior of an artificial ecological closed loop in low orbit and verify the hypothesis that aquatic life is not affected by exposure to space conditions using a complementary organism. The female fish were retrieved in good physiological condition, adult and

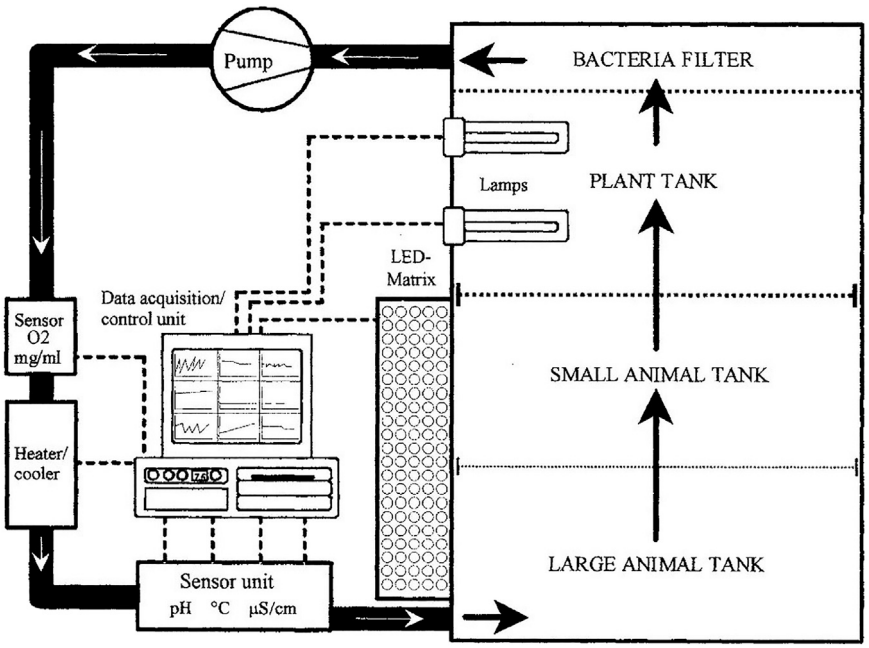


FIGURE 3 | Aquatic CEBAS module diagram demonstrating the trophic chain concept (extract from Bluem et al., 2000).

juvenile fish had a survival rate of about 33%, and almost 97% of the snails had survived and produced more than 250 neonates in microgravity (Bluem et al., 2000). During the spaceflight, the vertebrates were video-recorded for behavioral analysis and no aberrant looping or spinning behavior was observed. Immediately after landing back on Earth, the adult fish swam vertically, head upward, to the top of their habitat, strongly beating the caudal and pectoral fins. This was due to empty swim bladders not used during the spaceflight and reuse acclimation on Earth (Anken et al., 2000; Bluem et al., 2000; Rahmann and Anken, 2002).

In April 1998, another population of swordtail fish and four adult wild marine fish oyster toadfish (*Opsanus tau*) flew with the space shuttle STS-90 mission, hosted in the Neurolab facility. After 16 days in real microgravity, fish brain synaptic contacts were compared to a control population at 1 g on Earth. Spaceflight yielded an increase in synaptic contacts within the vestibular nucleus indicating a compensation processes for neonates swordtail fish (Ibsch et al., 2000). Results revealed a gravity compensation process and the role of the fish lateral line associated to the fish brain for appropriate swimming behavior (Anken et al., 2002).

The Vestibular Function Experiment Unit (VFEU) aboard STS-95's SpaceHab again hosted two oyster toadfish as experimental subjects. The fish were electronically monitored to determine the effect of gravitational changes on the otolith system. The freely moving fish provided physiological signals of the otolith nerves. Measurements of afferent and efferent responses were made before, during, and post-flight (Boyle et al., 2001).

In January 2003, four medaka eggs laid on Earth in an artificially controlled environment were launched by the Columbia space shuttle during the STS-107 mission. For the control, four eggs in the same condition remained on the ground. No difference was observed in the time of development. In the ground experiment, the embryos were observed to rotate in the egg membrane, whereas in flight they did not rotate. One egg hatched 8 days after the mission launch in the flight unit, while four eggs hatched in the ground unit. In the flight unit, the fry was observed with its back usually to the camera and little swimming movement suggest. The results shown no appreciable difference in the time course of development between space- and ground-based embryos. (Niihori et al., 2004). The hatched medaka larva, embryos and the crew from the space mission tragically never returned to Earth alive due to the accident during the space shuttle's reentry in the atmosphere.

In 2007, dry eggs of the ornamental killifish the redtail notho (*Nothobranchius guentheri*) were placed into cotton-cloth bags, then into plastic Petri dishes, and fastened on the outer side of the ISS. The aim of the Biorisk-MSN mission was to expose dry incubated eggs to low orbit radiation. Unfortunately, no data is available concerning the resistance of the fish eggs as the equipment had no temperature sensor and the plastic dishes reached 95°C, deforming the plates, and the eggs died due to the high temperature and vacuum contact (Baranov et al., 2009).

To study the fish response at early stage to microgravity, two missions using medaka fish were performed on ISS, in 2012 and 2014. Each time a Soyuz rocket sent 24 juveniles medaka (6 weeks after hatching, 16 mm) with the objective of rearing this population in the Aquatic Habitat (AQH) on the Kibo section of the ISS. Medaka fish in space and control fish from the same family on Earth were filmed. The movies showed that the fish became adapted to life under microgravity although despite an unusual swimming

TABLE 2 | Studies of ornamental fish used as a physiological model in low orbit missions. References to major missions are noted with numbers in brackets: [1] Baumgarten, 1975; [2] Proshchina, 2021; [3] Hoffman, 1977; [4] Ijiri, 1998; [5] Anken, 2000; [6] Anken, 2002; [7] Boyle, 2001; [8] Niihori, 2004; [9] Baranov et al., 2009; [10] Chatani, 2015; Murata, 2015; [11] Chatani, 2016.

Year	Fish species	Mission	Low orbit station	Duration	Fish stage	Embryos	Study aim
1973	Mummichog *Fundulus heteroclitus*	Apollo [1] CSM-117	*Skylab 3* 558 orbits	59 days	2 fingerlings (post-hatching)	Fish eggs	Video Hatching and normal behavior
1974	Zebrafish *Brachidanio rerio*	Soyuz 16 [2]		5 days 22 h	–	Five somites	Weightlessness
1975	Mummichog *Fundulus heteroclitus*	MA-161 [3]	*Apollo-Soyuz*	9 days	28 juveniles (21 days old)	32, 66, 128, 216, 336 hpf	Return Hatching and behavior analysis
1975	Mummichog *Fundulus heteroclitus*	Cosmo782 [2]	*Bion*	19 days	–	Fish eggs	Fixation after landing
1976	Zebrafish *Brachidanio rerio*	Soyuz 21 [2]	*Salyut* 5	7.5 days	–	Medium gastrula	Fixation after landing
1976	Zebrafish *Brachidanio rerio*	Soyuz 22 [2]	*Salyut* 5	49 days	–	Late gastrula	Fixation weightlessness
1994	Medaka *Oryzias latipes*	STS-65 [4] Columbia	IML-2	15 days	4 adults Fertilization in space	43 laid eggs, 8 hatched	30 hatched after landing
1998	Swordtail fish *Xiphophorus helleri*	STS-89 [5] *Endeavour*	MIR	8 days	4 pregnant adults 200 juveniles	–	Video–Return–behavior
1998	Swordtail fish Oyster toadfish *Opsanus tau*	STS-90 [6] *Columbia*	Neurolab CEBAS	16 days	4 toadfish 150–700 g	–	Vestibular compensation Synapse formation
1998	Oyster toadfish *Opsanus tau*	STS-95 [7] *Discovery*	SpaceHab	9 days	2 adults	–	Vestibular monitoring while swimming
2003	Medaka *Oryzias latipes*	STS 107 [8] *Columbia*	AHAB *Aquatic habitat*			4 embryonated eggs	Hatching launch + 8 days
2007	Redtail notho *Nothobranchius guentheri*	Soyuz [9] BioRisk-MSN	ISS	406 days	–	Dry fertilized eggs	Outside exposure failed
2011	Goldenfish + Oyster toadfish *Opsanus tau*	STS-135 (last mission) *Atlantis*	Aquatic animal experiment unit	12 days	6 juveniles	Fertilized eggs	Otolith removed–eggs returned
2012	Medaka *Oryzias latipes*	Soyuz [10] TMA-06M	ISS *Kibo Module*	60 days	24 juveniles	–	Fish behavior gene fluo-signals
2014	Medaka *Oryzias latipes*	Progress [11] M-22M	ISS *Kibo Module*	8 days	24 larvae	Hatching in low orbit	Fluorescence microscopy

behavior. In addition, a mating behavior was observed under microgravity at day 33 and was not different from that on the Earth, indicating microgravity environment doesn't disturb fish reproduction. The aquarium fish used for this experiment have fluorescent osteoclast cells, which makes them easier to observe. An osteoclast is a type of bone cell that breaks down bone tissue and responsible for bone loss. After 47 days in space, the fish tended to stay still in the tank. After 56 days, the mission fish group had normal growth compared to a terrestrial control. For fish in microgravity impairment of some physiological functions was accompanied by the activity of osteoclasts and a slight decrease in mineral density and vertebral bones. (Chatani et al., 2015; Murata et al., 2015; Chatani et al., 2016). Historical space missions involving ornamental fish are listed in **Table 2**.

Missions With Aquaculture Fish in Low Orbits

Very few missions involving aquaculture fish have been carried out to date (**Table 3**). In one of these, the common carp (*Cyprinus carpio*)—considered a very important aquaculture species in many countries–was chosen as a model for a sensor motor experiment by Japanese university teams and the Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA). Two colored carp (16 months old, 26 cm and 263–270 g) were carried to the American SpaceLab in 1992. One of the two carp was given a labyrinthectomy (the otolith was removed). For both fish, swimming behavior and dorsal light response was studied and compared. As observed during the first space missions with small fish, the normal carp was unstable (associated with a kind of space motion-sickness) for the first three days, then finally recovered its Earth-based swimming behavior. The fish whose otolith was removed two months before showed a normal dorsal light response 22 h after launch, and disruption for the next two days as with the normal carp. Unfortunately, the recovery process for the fish with the removed otolith could not be evaluated due to a technical issue, but these observations provided evidence of a sensory-motor disorder during the early phase of adaption to microgravity in aquaculture fish (Mori et al., 1996). The change in body weight was monitored from two days before launch to four days after landing. Both fish recorded a weight loss around 12% in low

TABLE 3 | Studies of aquaculture fish as models for sensory motor, reflex experiments and trophic chain demonstrations in low orbit missions. References to major missions are noted with numbers in brackets: [12] Mori, 1994 [13] Sebastian, 2001 [14] Anken, 2016.

Year	Fish species	Mission	Low orbit station	Duration	Fish stage	Embryos	Study aim
1992	Common carp *Cyprinus carpio*	STS-47 [12] *Endeavour*	Space Lab-J ML2	8 days	2 carp (263–270 g)	–	Sensory motor experiment
1993	Tilapia *O. mossambicus*	STS-55 [13] *Columbia*	Space Lab D-2	9 days	Larvae (post-hatching)	–	Vestibuloocular reflex test
1997	Tilapia *O. mossambicus*	STS-84 [13] *Atlantis*	MIR SMM-06	10 days	Larvae (post-hatching)	–	Vestibuloocular reflex test–video
2007	Tilapia *O. mossambicus*	Soyuz-U [14]	Foton M3	12 days	26 larvae (12 mm)	–	Video–vestibular organ–enzymatic activity
2013	Tilapia *O. mossambicus*	Soyuz 2 *1a*	BION-M1	30 days	All fish died	–	Equipment failure

orbit after 14 days of fasting. No conclusion can be made as a fasting replicate on the ground was not available (Mori et al., 1994).

During space shuttle missions STS-55 (1993) and STS-84 (1997), tilapia *Oreochromis mossambicus* larvae that had not yet developed the roll-induced static vestibuloocular reflex were exposed to microgravity for 9–10 days. Young larvae (11–14 days after hatching) already exhibited the vestibuloocular reflex on the 1993 mission. Back on Earth, a vestibuloocular reflex test (fish were turned around their longitudinal axis at an angle of 15, 30, and 45°) showed that eye movement and reflex were not affected by exposure to microgravity during the two space missions (Sebastian et al., 2001).

The OMEGAHAB (Aquatic Habitat) is a closed artificial ecosystem that was sent into orbit for 13 days on board the Russian satellite FOTON-M3 in 2007. The goal of the mission led by the German Space Agency was to investigate the possibility of designing a trophic chain in real microgravity using the photosynthetic flagellate *Euglena gracilis* as an oxygen producer and larvae of tilapia *Oreochromis mossambicus* as a consumer. This freshwater and brackish species is a popular aquaculture fish, with worldwide production of around 15,000 tons per year. In the 2007 experiment, 26 small larvae (approx. 12 mm in length) in the flagellate aquarium were studied in low orbit to increase knowledge about the development of the vestibular organs and enzymatic activity. The best fish survival rate (42%) ever achieved in a German experiment was recorded. Conditions of real microgravity during spaceflight induced a larger than normal otolith compared to a control maintained at 1 g. This could result in a difference in the ability to sense gravity (Anken et al., 2016). In a same ground unit, the photosynthetic producers supplied sufficient amounts of oxygen to a fish compartment with 35 larval cichlids (Hader et al., 2006). Historical space missions involving aquaculture fish are listed in **Table 3**.

Feeding Fish in Space: Integrated Multi-Trophic Aquaculture

If fish were farmed on a space base, sending aquaculture feed from Earth to Moon or Mars would make no sense from an economic or lifecycle analysis point of view. Aquatic systems contain a large diversity of species with different roles in nutrient cycles and biomass conversion that contribute to ecosystem balance. Photosynthetic organisms (algae, phytoplankton), invertebrates (crustaceans, mollusks, zooplankton), vertebrates (fish, amphibians), and microorganisms interact in a complex trophic web. By associating different complementary species such as fish, filter feeders, detritivores and primary producers, integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) provides an innovative possibility for BLSS on the Moon or Mars.

The nutritional profile of fish is closely linked to their diet quality. In aquaculture, this can be easily adjusted by ensuring a fish feed formulation that includes organisms that synthesize or sequester proteins, lipids of interest (e.g., EPA or DHA), vitamins and minerals. These aquatic organisms can be cultivated separately in a chain (from algae to invertebrates to fish) exclusively with fish waste as a fertilizer or using other available waste from human activities, such as exhaled carbon dioxide, space agriculture byproducts, or residents food waste.

In the framework of sustainable aquaculture on Earth, researchers are studying trophic webs using closed or semi-closed aquatic systems that reuse fish nutrients dissolved in the water column or fish fecal matter as a fertilizer or food source for another aquatic organism. In an IMTA system, microalgae or macroalgae cultivation is easy using fish tank effluents, as the N/P ratio fits the requirements of algae: the increasing algae biomass assimilates nitrogen and phosphorus forms (Pagand et al., 2000). To return treated water back to the fish tank, it can be cleaned so it is safe for fish growth and welfare (Mladineo et al., 2010). Moreover, fish farm effluent is a suitable media for cultivating *Nannochloropsis gaditana*, a marine algae with a high PUFA content (Dourou et al., 2018). Several studies have reported the possibility of feeding aquaculture fish with microalgae (mostly marine) included in the fish feed formulation. Several microalgae strains have been tested successfully (they do not alter growth kinetics or organoleptic quality) with fish feed made up of 20–40% of microalgae: C*rypthecodinium* sp., *Phaeodactylum* sp. (Atalah et al., 2007) and *Schizochytrium* sp. (Ganuza et al., 2008; Stuart et al., 2021) have been tested for the seabream and amberjack diet; *Tetraselmis* sp. (Tulli et al., 2012), and *Isochrysis* sp. (Tibaldi et al., 2015) for European seabass; *Nanofrustulum sp*. for salmon, common carp and schrimps

(Kiron et al., 2012); and *Tetraselmis* sp. and *Isochrysis* sp. for cod (Walker and Berlinsky, 2011).

The modern feed form for aquaculture fish is dried pellets with less than 10% moisture. However, a study has shown that feeding fish using a moist formulation, such as algae or aquatic worms, with a water content around that of the natural prey profile in oceans, did not affect fish growth parameters and in fact increased resistance and immune protection (Przybyla et al., 2014). Thus, photosynthetic or invertebrate aquatic organisms produced in a Moon or Mars greenhouse could be fed directly to aquaculture fish with no transformation process. Researchers are exploring these alternatives to preserve wild fish stocks currently used for aquaculture fish feed (e.g., processed into fish meal and fish oil). Other algae sources with higher integration rates in feed formulations are the focus of future studies, while research is also investigating new types of aquatic prey compatible with fish feed, such as jellyfish (Marques et al., 2016).

The algae cultivated in an IMTA system, as well as fish effluent, can also be a feed source for invertebrates, mollusks (Li et al., 2019), and sea cucumbers (Chary et al., 2020). A team from NASA is studying the possibility of using invertebrate production systems to purify water while growing protein-rich species as food/feed sources. Aquatic species such as copepods or mussels should grow rapidly, offer good protein content and have low mass for launch requirements (Brown et al., 2021). In the ocean, copepods and mussels are the favored natural prey of fish (especially seabream) and can be used as live feed for aquaculture fish. This production could also serve as food for the human crew. Thus, aquatic invertebrates and microalgae could play a key role in a trophic chain on a space base.

In a recirculating aquaculture system, particulate matter is composed mainly of feces, mucus and bacterial clusters. This waste is easy to separate and remove from the RAS. Some copepods can use this media as feed, but another invertebrate is being studied for its ability to reduce this particulate matter and convert it into valuable biomass: the aquatic worm (Galasso et al., 2020). Polychaeta are detritivores and can be a feed source of interest for fish. Aquatic worms cultivated in an RAS can convert fecal matter into useful fatty acids for fish feed (Kicklighter et al., 2003; Bischoff et al., 2009; Palmer et al., 2014). Other synergies might also be possible: for example, *Caenorhabditis elegans* is a small terrestrial nematode already studied in space as a model for ageing in microgravity, as 35% of *C. elegans* genes have human homologs (Honda et al., 2014). This nematode could thus be both cultivated and observed in space in a BLSS.

In wild environments on Earth, a fish's diet is composed of its own congener, algae or invertebrates. Ground-based experiments have evaluated Nile tilapia as a bioregenerative sub-process for reducing solid waste potentially encountered in a space aquaculture system (Gonzales, 2009). The Tilapia feed formulation consisted of vegetable, bacterial, or food waste. Sulfur, nitrogen, protein, carbon and lysine content of waste residues were assimilated, sequestered and recycled in Tilapia muscle. Although Tilapia's specific growth rate from population fed with different fibrous waste were widely inferior (1.4—89.8 mg/day^{-1}) compared to the control population (281.6 mg/day^{-1}), the Tilapia's survival rate was not different. These results suggest additional research to improve feed formulation composed with fibrous residues (Gonzales and Brown, 2007).

When considering formulating aquaculture fish feed on a space base using exclusively aquatic organisms cultivated in an IMTA system, it is essential to determine the digestive efficiency of the fish feed. A recent study highlighted the extreme flexibility of European seabass to feed formulations without fish meal and fish oil. In the experiment, fish were given several formulations containing 85% plant sources and 15% alternative sources (yeast, insects, and processed animal protein or *Arthrospira platensis*). Zootechnical results showed that three formulations resulted in a growth equal to fish fed with a traditional commercial formulation including a wild fish source. The bacterial community in the fish digestive tract adapted to the new formulation composed of alternative protein and lipid sources, and bacterial diversity was not altered (Perez-Pascual et al., 2020). This plasticity is probably common to other fish species, allowing a promising avenue to test new innovative formulations for aquaculture fish using exclusively BLSS raw matter sources such as cyanobacteria, plants, algae, and invertebrates.

Applicability and Limitations of a Space Aquaculture System

Like the systems for other types of food sources being studied for a future BLSS, such as those to produce microalgae and higher plants (Tikhomirov et al., 2007), the design of a space aquaculture system (SAS) is subject to various parameters, including the location in the Solar System. The size of the SAS would depend on the number of residents to feed, the other food sources necessary based on nutritionist's recommendations, the space available on the lunar base, water availability and quality, the energy available for this activity, and the duration the BLSS will need to operate. One scenario might be to provide around 250 g of fish per person per week. The volume of the tank for rearing the fish should also be correlated to the fish growth rate and the frequency at which the fish are harvested. The diversity of fish species allows possibilities to be imagined such as using the area under the floor of the lunar base for flat fish, for example, or a tank that is not connected to the crew's living area.

On the Moon as on Earth, an aquaculture system requires water circulation. While the energy needed to pump water in an SAS with lunar gravity (one-sixth of Earth's gravity) is yet to be defined, maintaining a set water temperature will have an energy cost. Within a window of tolerance depending on the species, fish growth directly depends on the water temperature (Handeland et al., 2008). In a context of 14 days of Sun exposure and 14 days of darkness, the latter period will require warming the water to maintain the growth rate. Thus the thermal profile of the selected species will be one of the parameters to consider. This aspect will have a direct impact on the total energy required for an acceptable growth yield in the SAS.

Although fish have a low oxygen uptake compared to other vertebrates (**Figure 2**), a regular supply is required. Oxygen dissolution in the water from hydroxyl extraction and oxygen from the regolith and/or from photosynthesis in plants cultivated in the BLSS must be synchronized with the biological demands of the fish. This requires the capacity to regularly collect, store and

dissolve oxygen in the water column. The oxygen data from the CEBAS experiment on the STS-89 and STS-90 missions was analyzed to model this concept. Results based on the experimental MINI-MODULE (8.6 L) showed different periods of oxygen accumulation and depletion in the aquatic habitat in plants (oxygen producer) and snails (oxygen consumer). Simulations from ground-based models predict the oxygen concentration and can be adapted for other species (Drayer and Howard, 2014). A trend has to be defined between the volume of oxygen instantly available or stored and the demand of aquatic consumers. This highlights the importance of an oxygen buffer tank linked to a feedback control mechanism (possibly remotely controlled from Earth) in case of a lack of oxygen. Another aspect to monitor is bacterial development inside the system. An axenic environment cannot be considered as bacteria play an essential role in all stages of a balanced ecosystem. Yet bacteria activity affects the nutrient budget and oxygen measurement and availability (Konig et al., 2001). All these parameters will drive the size of the SAS and the fish biomass allowed in an extreme environment such as the Moon.

Another issue to consider is aquatic biomass extraction in the space environment. Harvesting cells such as microalgae is a current challenge, today handled using vacuum and flocculation (Barrut et al., 2012). The development of harvesting tools is required for different aquatic organisms in a limited and constrained space. Regardless of the organism, extraction is necessary when the biomass has reached its optimum growth to avoid uncontrolled water degradation and increased oxygen consumption by microorganisms that would endanger fish production.

The time needed for fish management on a lunar base also depends on the size of the SAS. Current technology developed for RAS drastically reduces the time necessary to maintain the system. Most of the tasks can be automated, such as starting and cleaning the biofilter, monitoring water parameters (Konig et al., 2001), and regulating the water. Fish feeding is a time-consuming task, but this can also be automated. Fish are able to adapt to self-feeding devices (Coves et al., 1998; Di-Poi et al., 2008), which contribute to the social interaction of the population (Chen et al., 2002). As in plant production systems (Bamsey et al., 2009), several automated SAS actions could be carried out remotely from a control room on Earth. A daily routine (visual checking of the system and fish behavior and non-automated actions) could be considered to involve around 1 h every 12 h for a closed loop system composed of 16 tanks (1 m^3) and 8 kg/m^3 of fish biomass (based on personal experience).

The energy available to power the SAS will also determine its design. A ground-based greenhouse simulation for food production with lunar constraints is necessary to study and understand gas flow management, organism interactions, and all related parameters necessary to maintain a stable and balanced ecosystem.

Studying the Feasibility of Sending Aquaculture Fish Embryos to the Moon: The Lunar Hatch Program

In research underway since 2019, the Lunar Hatch program is investigating the feasibility of shipping embryonated aquaculture fish eggs to space for programmed hatching in a lunar BLSS. The hatched larvae would then be fed with local resources and reared until they reached an appropriate size for human consumption. The aim of the study is proof of concept based on experimental data collected first in ground-based trials, followed by test missions in low orbit, and concluding with a real flight to space, perhaps leading to the hatching of the first vertebrate on the Moon.

The program focuses on the viability of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) for such a project, by analyzing the potential effects on embryos of a Moon journey and the associated environmental changes. Water found on celestial bodies in the Solar System have a saline or hypersaline profile. The choice of the European seabass in the Lunar Hatch program was based on the fact it is a marine organism with an appreciated taste, and its physiology and behavior have been abundantly described. A secondary water source for fish aquaculture could also be considered such as recycled water from a greenhouse or non-potable water from technical process or human activities. The diversity of aquaculture fish species allows the appliacation of many potential "fishonauts", depending on the primary or secondary water resource available *in situ* (fresh or salt water). Other aquaculture species could equally be considered for rearing in space, such as trout, flat fish or shrimp.

As mentioned, in the 1970s, spaceflight tests were carried out at the egg stage with ornamental fish (**Table 2**). The choice of eggs as the biological stage for space travel is relevant for several reasons. A low volume of water is required for egg incubation, so the initial launch biological payload could be less than 1 kg for around 900 future larvae. In aquaculture nurseries, European seabass egg density in the water column is around one egg per milliliter. Unlike the larval or adult stages, the embryogenesis phase is suitable for a spaceflight because embryo development does not require human intervention for several days (the duration of embryogenesis depends on the species). Although embryogenesis involves intense metabolic activity for the development of the future larva, the low biomass and the chorion limit catabolite emission as well as the self-pollution of water during the journey. This would allow either long manned spaceflights with no need for maintenance from the crew, or simply the transport of fish eggs using an automated cargo ship.

Compared to normal conditions in land-based aquaculture production, during a spaceflight fish embryos would be initially subjected to atypical acoustic and mechanical vibrations caused by launcher motors and acceleration in the atmosphere. The effects of this are under study in the framework of the Lunar Hatch program (supported by the French National Institute for Ocean Science, Ifremer) using a standard qualification test commonly employed in the space industry. In a recent experiment, a vibration exciter mimicked the conditions of a SOYUZ-2/FREGAT launch on a population of fish embryos (**Figure 4**).

In this test, two triplicates ($n = 300$) of embryos of aquaculture species (European seabass and meagre in two separate experiments) were submitted to the acoustic and mechanical environment of a launch for 10 min at one-third and two-thirds of their development. The hatching rate was then compared to a control triplicate ($n = 300$). No significant differences were observed on the hatching rate for either species whatever the

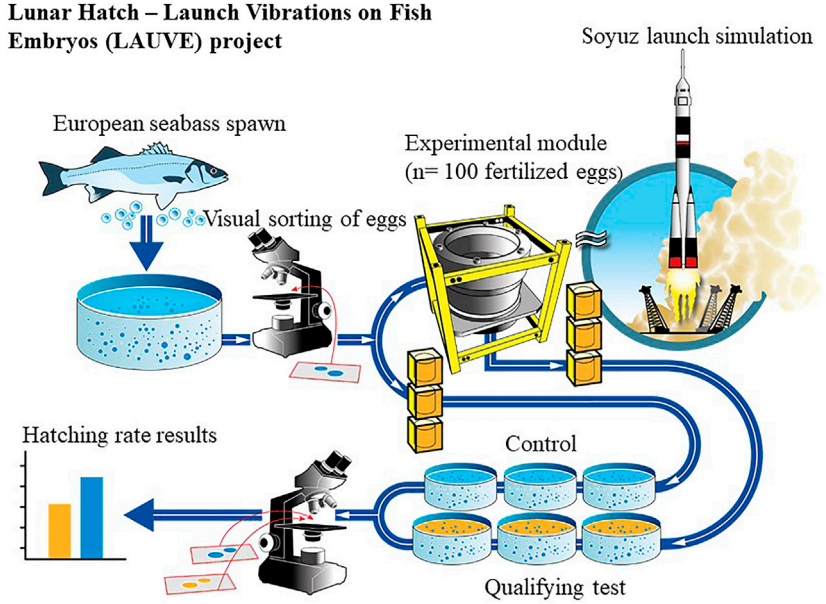


FIGURE 4 | Protocol for the acoustic and mechanical vibrations qualifying test on European seabass embryos (from Przybyla et al., 2020).

stage of development when the embryos were exposed to the conditions (**Figure 5**).

These encouraging results indicate the egg robustness of two major aquaculture species. A credible hypothesis to explain these results is that the success of the global aquaculture industry is based on the selection of aquatic species for robustness criteria to actions such as unusual and stressful handling–especially at an early lifecycle stage–such as sorting, sampling, transfer from aquarium to tank, or long transport by road or air. The aquaculture sector has selected the most biologically flexible strains with the most interesting nutritional profile for economic reasons. The resulting robustness could benefit space programs–it would not be surprising if other aquaculture species also successfully pass this qualifying test.

Beyond intense vibrations, understanding the influence of hypergravity and microgravity on embryonic development is essential to evaluate the feasibility of space aquaculture. Previous studies on ornamental aquarium fish can provide some information on fish behavior and physiology in space that may be useful.

Hypergravity is experienced during rocket take-off, an acceleration phase that lasts about 10 min at 4–8 g, depending on the launcher motors. This situation was tested on swordtail fish and medaka otoliths (Anken et al., 1998; Ijiri et al., 2003; Brungs et al., 2011; Anken et al., 2016) and larvae bone development (Aceto et al., 2015; Chatani et al., 2015), but its effects on early ontogeny (hatching capability) are as yet poorly described. A recent research showed that six month exposition at 5 g can induce vertebral curvatures and asysmetric otoliths (Chatani et al., 2019). However, the duration of exposure to hypergravity during a launch to the Moon or Mars will be about 10 min, the time to extract the embryos from the Earth's attraction. Ongoing experiments are exploring the ability of aquaculture finfish embryos to develop in these conditions. It is credible to posit that hypergravity applied to a water reservoir may be less felt by a submerged embryo. In contrast to poultry eggs stored in air, the water density surrounding fish eggs may reduce the acceleration force on the chorion.

Following the initial conditions of rocket vibrations and acceleration, a situation of microgravity appears beyond an altitude of 110 km. During the entire evolution of life on Earth, the development of all organisms took place under constant gravity conditions in different media (air/water). It should be noted that in the ocean, fish embryos are already in a kind of microgravity compared to terrestrial organisms due to Archimedes' principle and other physical phenomena. This is why, to simulate partial microgravity, astronaut training exercises are carried out in a swimming pool. A study has found that embryos of *Xenopus* (an aquatic frog) are able to adjust to microgravity environments until hatching through an adaptation mechanism and strategy (Black et al., 1995). Might this capability be common to other aquatic organisms, including fish embryos? Supported by the French space agency (CNES), the Lunar Hatch program plans to study the embryo behavior of European seabass in hypergravity and microgravity in the Gravitational Experimental Platform for Animal Models (GEPAM), a European Space Agency platform to test different gravity environments on animals (Bonnefoy et al., 2021).

Exposure to radiation during the space journey will be the last environmental change investigated in future Lunar Hatch program studies: this is probably the parameter with the most impact on fish embryo biology. Knowledge about the effects of space radiation on a variety of organisms has increased over the last decades: for bacteria (Leys et al., 2009), plant and mammalian cells (Arena et al., 2014), and amphibians (Fuma et al., 2014). A ground-based study on the influence of radiation on fish immediately post-hatching was carried out on the ornamental zebrafish (*Danio rerio*), in which eggs were irradiated with doses ranging from 1 to 1,000 $mSv.d^{-1}$ for 20 days (Simon et al.,

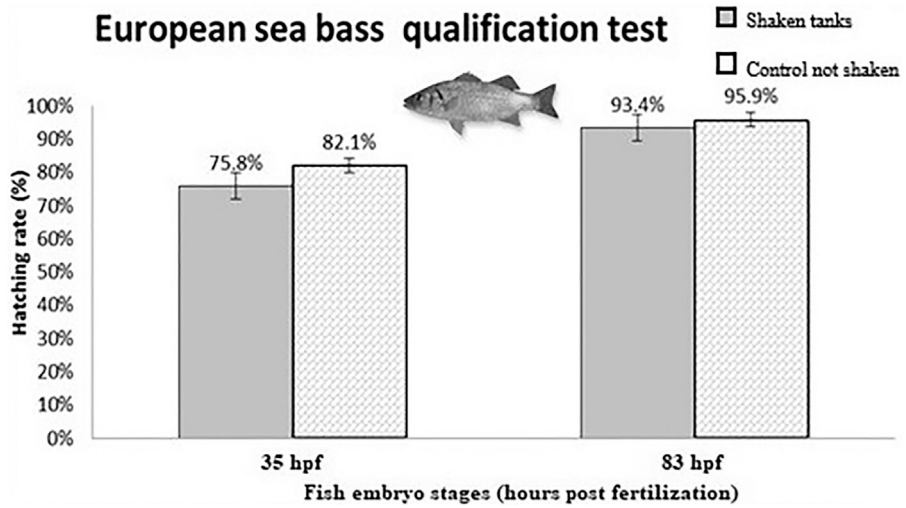


FIGURE 5 | European seabass embryo hatching rate following acoustic and mechanical vibrations from a simulated Soyuz launch qualification test (from Przybyla et al., 2020).

2011). At the stage of 3 days post-hatching, no significant difference in mortality was observed between irradiated eggs and the control. The maximum daily dose was 100 times greater than the total dose astronauts were subjected to during the Apollo 11 mission. These results are consistent with a study in which no significant difference in mortality was observed between 0.8 mGy (the threshold recommended to protect ecosystems) and 570 mGy delivered per day, but the radiation exposure induced accelerated hatching for both doses and a decrease in yolk bag diameter for the highest dose (Gagnaire et al., 2015). In contrast, another study exposing zebrafish embryos to 1, 2.5, 5, 7.5, and 10 mGy of gamma radiation at 3 hpf showed that increasing gamma radiation increased DNA damage, decreased hatching rate, increased median hatching time, decreased body length, increased mortality rate, and increased morphological deformities (Kumar et al., 2017). A higher total dose but spread over time therefore seems to be less harmful than a single high dose concentrated in the early stages of development. Gagnaire et al. also found abnormal development of the spine for individuals subjected to 570 $mGy.d^{-1}$. These research results on a small fish provide useful information for countermeasures that would need to be implemented on a lunar base. Fish and crew should be protected to reduce cosmic ray damage. Fish embryos could benefit from progress in countermeasure technology developed for humans, but it would be valuable to conduct experiments on the impact of different particles and charges (separate and cumulative) from cosmic radiation on the candidate fish.

CONCLUSION

The Lunar Hatch program is investigating the prospects of lunar aquaculture based on a circular food system using a selected species at a specific stage of the lifecycle. It may be of interest to investigate other aquaculture species for other targeted planets or other lifecycle development stages. In the case of the Moon, it is so close to Earth that rearing adults for reproduction would not be worthwhile: a regular shipment of fertilized eggs for monthly generation would avoid costly fish-spawning management on the lunar base. For a more distant destination such as Mars, the embryo stage would be realistic for the first part of the mission, but the total flight would be longer than the duration of embryogenesis. In this case, larval development would need to be considered during the multi-month journey. For farther destinations, studies would need to determine the possibility of rearing broodstock to control the entire biological lifecycle in space.

Space aquaculture would provide a valuable food source in addition to those already studied for long-term missions. The diversity of nutrients provided by fish and the benefits for human metabolism may help in the challenges of space medicine, in particular the prevention of cancer caused by long-term exposure to radiation. The activity of fish farming itself could have positive psychological and cognitive effects. Reports about plant-growth chambers on manned missions have described the psychological benefits of working with living organisms in space. An investigation involving social scientists could be conducted to better understand the possible positive benefits of human–animal interaction in space. Vertebrates may recall basic human activities and provide a psychological umbilical cord with the Earth.

Modern recirculating aquaculture systems share many characteristics with the closed bioregenerative life-support systems planned for space. Progress in aquaculture technology on land and in space can feed into each other. For example, developments that allow space aquaculture systems to recover and convert waste molecules into edible food could be deployed on Earth to increase food availability while avoiding waste discharge in the environment and preserving biodiversity. Joint efforts to design such waste

conversion systems will be applicable above all to human activities on Earth.

Like other aspects of BLSS, while space aquaculture is close to being a reality, it is highly dependent on the water and energy available *in situ*. At the turn of the 20th century, the Russian father of astronautic science Konstantin Tsiolkovsky wrote: "Earth is the cradle of humanity, but one cannot remain in a cradle forever." Plants and animals are part of the human biosphere and food chain. Space exploration will likely be more successful if humans leave the cradle with a part of their own biosphere and their knowledge of agricultural science, including aquaculture.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The author confirms being the sole contributor of this work and has approved it for publication.

FUNDING

The Lunar Hatch program is supported by the French National Institute for Ocean Science (Ifremer). The author would like to thank Ifremer's scientific directorate, the European and international affairs directorate, and the biological and environmental resources department for supporting and funding the space aquaculture project. The author warmly thanks the technicians, engineers and researchers involved in the project: G. Dutto, B. Rollin, E. Gasset, S. Triplet, E. Mansuy, B. Geffroy, S. Lallemand, and T. Laugier, among others. The Lunar Hatch program is also supported by the French National Centre for Space Studies (CNES), funded under the 2019 and 2020 call for research projects (APR-DAR4800001044). The author warmly thanks G. Gauquelin-Koch, A. Paillet, G. Rabin, and F. Spiero from CNES for their relevant comments and their support.

ACKNOWLEDGMENTS

The author is also grateful to L. Dusseau and M. Bernard from the University Space Center of Montpellier (CSUM), the historical partners of the Lunar Hatch program, A. Fuchs and V. Ribière for valuable discussions and useful contacts in the space industry, and E. Bradbury for the editorial review of the article.

REFERENCES

Aceto, J., Nourizadeh-Lillabadi, R., Marée, R., Dardenne, N., Jeanray, N., Wehenkel, L., et al. (2015). Zebrafish Bone and General Physiology Are Differently Affected by Hormones or Changes in Gravity. *Plos One* 10 (6), e0126928. doi:10.1371/journal.pone.0126928

Anken, R., Brungs, S., Grimm, D., Knie, M., and Hilbig, R. (2016). Fish Inner Ear Otolith Growth under Real Microgravity (Spaceflight) and Clinorotation. *Microgravity Sci. Technol.* 28 (3), 351–356. doi:10.1007/s12217-015-9459-4

Anken, R. H., Hilbig, R., Ibsch, M., and Rahmann, H. (2000). "Readaptation of Fish to 1g after Long-Term Microgravity: Behavioural Results from the STS 89 mission," in *Life Sciences: Microgravity and Space Radiation Effects*. Editors K. Slenzka, M. Vazquez, and F. A. Cucinotta, 25, 2019–2023. doi:10.1016/s0273-1177(99)01009-1

Anken, R. H., Ibsch, M., and Rahmann, H. (2002). "Microgravity (STS-90 Neurolab-Mission) Influences Synapse Formation in a Vestibular Nucleus of Fish Brain," in *Space Life Sciences: Biological Research and Space Radiation*. Editors K. Ijiri, K. Slenzka, and A. Kronenberg, 30, 843–847. doi:10.1016/s0273-1177(01)00643-3

Anken, R. H., Ibsch, M., and Rahmann, H. (1998). Neurobiology of Fish under Altered Gravity Conditions. *Brain Res. Rev.* 28 (1-2), 9–18. doi:10.1016/s0165-0173(98)00021-6

Arena, C., De Micco, V., Macaeva, E., and Quintens, R. (2014). Space Radiation Effects on Plant and Mammalian Cells. *Acta Astronautica* 104 (1), 419–431. doi:10.1016/j.actaastro.2014.05.005

Atalah, E., Cruz, C. M. H., Izquierdo, M. S., Rosenlund, G., Caballero, M. J., Valencia, A., et al. (2007). Two Microalgae Crypthecodinium Cohnii and Phaeodactylum Tricornutum as Alternative Source of Essential Fatty Acids in Starter Feeds for Seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 270 (1-4), 178–185. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.009

Bamsey, M., Berinstain, A., Graham, T., Neron, P., Giroux, R., Braham, S., et al. (2009). Developing Strategies for Automated Remote Plant Production Systems: Environmental Control and Monitoring of the Arthur Clarke Mars Greenhouse in the Canadian High Arctic. *Adv. Space Res.* 44 (12), 1367–1381. doi:10.1016/j.asr.2009.08.012

Baqué, M., Verseux, C., Rabbow, E., de Vera, J.-P. P., and Billi, D. (2014). Detection of Macromolecules in Desert Cyanobacteria Mixed with a Lunar Mineral Analogue after Space Simulations. *Orig Life Evol. Biosph.* 44 (3), 209–221. doi:10.1007/s11084-014-9367-4

Baranov, V. M., Novikova, N. D., Polikarpov, N. A., Sychev, V. N., Levinskikh, M. A., and Alekseev, V. R. (2009). The Biorisk experiment: 13-month Exposure of Resting Forms of Organism on the Outer Side of the Russian Segment of the International Space Station: Preliminary Results. *Doklady Biol. Sci.* 426 (1), 267–270. doi:10.1134/s0012496609030223

Barrut, B., Blancheton, J.-P., Champagne, J.-Y., and Grasmick, A. (2012). Water Delivery Capacity of a Vacuum Airlift - Application to Water Recycling in Aquaculture Systems. *Aquacultural Eng.* 48, 31–39. doi:10.1016/j.aquaeng.2011.12.010

Baumgarten, v. (1975). Effect of Prolonged Weightlessness on the Swimming Pattern of Fish Aboard Skylab 3. *Aviat Sapce Environ. Med.* 46 (7), 902–906.

Bischoff, A. A., Fink, P., and Waller, U. (2009). The Fatty Acid Composition of Nereis Diversicolor Cultured in an Integrated Recirculated System: Possible Implications for Aquaculture. *Aquaculture* 296 (3-4), 271–276. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.09.002

Black, S., Larkin, K., Jacqmotte, N., Wassersug, R., Pronych, S., and Souza, K. (1995). "Regulative Development of Xenopus laevis in Microgravity,". *Life and Gravity: Physiological and Morphological Responses*. Editors P. Todd, H. J. Anton, P. W. Barlow, R. Gerzer, J. M. Heim, R. HemmersbachKrause, et al.209–217. doi:10.1016/0273-1177(95)00637-t

Bluem, V., Andriske, M., Paris, F., and Voeste, D. (2000). "The C.E.B.A.S.-Minimodule: Behaviour of an Artificial Aquatic Ecological System during Spaceflight," in *Life Sciences: Space Life Support Systems and the Lunar Farside Crater Saha Proposal*. Editors T. W. Tibbitts, R. M. Wheeler, C. A. Mitchell, and J. Heidmann (Oxford: Pergamon Press Ltd)), 26, 253–262. doi:10.1016/s0273-1177(99)00569-4

Bluem, V., and Paris, F. (2003). "Possible Applications of Aquatic Bioregenerative Life Support Modules for Food Production in a Martian Base," in *Space Life Sciences: Missions to Mars, Radiation Biology, and Plants as a Foundation for Long-Term Life Support Systems in Space*. Editors G. Horneck, M. E. Vazquez, and D. M. Porterfield, 31, 77–86. doi:10.1016/s0273-1177(02)00659-2

Blum, V., Andriske, M., Kreuzberg, K., and Schreibman, M. P. (1995). Animal Protein Production Modules in Biological Life Support Systems: Novel

Combined Aquaculture Techniques Based on the Closed Equilibrated Biological Aquatic System (CEBAS). *Acta Astronautica* 36 (8-12), 615–623. doi:10.1016/0094-5765(95)00150-6

Blüm, V., Kreuzberg, K., and Stretzke, E. (1994). "C.E.B.A.S. Mini Module: Test Results of an Artificial (Man-made) Aquatic Ecosystem,". *Life Sciences and Space Research Xxv*. Editors R. D. MacElroy, C. A. Mitchell, M. Andre, C. C. Blackwell, T. W. Tibbitts, A. Banin, et al. (Oxford: Pergamon Press Ltd)), 14, 89–98. doi:10.1016/0273-1177(94)90284-4

Bonnefoy, J., Ghislin, S., Beyrend, J., Coste, F., Calcagno, G., Lartaud, I., et al. (2021). Gravitational Experimental Platform for Animal Models, a New Platform at ESA's Terrestrial Facilities to Study the Effects of Micro- and Hypergravity on Aquatic and Rodent Animal Models. *Ijms* 22 (6), 2961. doi:10.3390/ijms22062961

Boyle, R., Mensinger, A. F., Yoshida, K., Usui, S., Intravaia, A., Tricas, T., et al. (2001). Neural Readaptation to Earth's Gravity Following Return from Space. *J. Neurophysiol.* 86 (4), 2118–2122. doi:10.1152/jn.2001.86.4.2118

Brown, L., Peick, J., Pickett, M., Fanara, T., Gilchrist, S., Smiley, A., et al. (2021). Aquatic Invertebrate Protein Sources for Long-Duration Space Travel. *Life Sci. Space Res.* 28, 1–10. doi:10.1016/j.lssr.2020.10.002

Brungs, S., Hauslage, J., Hilbig, R., Hemmersbach, R., and Anken, R. (2011). Effects of Simulated Weightlessness on Fish Otolith Growth: Clinostat versus Rotating-Wall Vessel. *Adv. Space Res.* 48 (5), 792–798. doi:10.1016/j.asr.2011.04.014

Cadek, O., Tobie, G., Van Hoolst, T., Masse, M., Choblet, G., Lefevre, A., et al. (2016). Enceladus's Internal Ocean and Ice Shell Constrained from Cassini Gravity, Shape, and Libration Data. *Geophys. Res. Lett.* 43 (11), 5653–5660. doi:10.1002/2016gl068634

Chary, K., Aubin, J., Sadoul, B., Fiandrino, A., Coves, D., and Callier, M. D. (2020). Integrated Multi-Trophic Aquaculture of Red Drum (Sciaenops Ocellatus) and Sea Cucumber (Holothuria Scabra): Assessing Bioremediation and Life-Cycle Impacts. *Aquaculture* 516:734621 doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734621

Chatani, M., Mantoku, A., Takeyama, K., Abduweli, D., Sugamori, Y., Aoki, K., et al. (2015). Microgravity Promotes Osteoclast Activity in Medaka Fish Reared at the International Space Station. *Scientific Rep.* 5 (1). doi:10.1038/srep14172

Chatani, M., Mitsuhashi, A., Dodo, Y., Sakai, N., and Takami, M. (2019). Hypergravity Induces Vertebrae and Otolith Deformation in Medaka Fish. *Biol. Sci. Space* 33, 12–17. doi:10.2187/bss.33.12

Chatani, M., Morimoto, H., Takeyama, K., Mantoku, A., Tanigawa, N., Kubota, K., et al. (2016). Acute Transcriptional Up-Regulation Specific to Osteoblasts/osteoclasts in Medaka Fish Immediately after Exposure to Microgravity. *Scientific Rep.* 6, 39545. doi:10.1038/srep39545

Chen, W., Naruse, M., and Tabata, M. (2002). The Effect of Social Interactions on Circadian Self-Feeding Rhythms in Rainbow trout Oncorhynchus mykiss Walbaum. *Physiol. Behav.* 76 (2), 281–287. doi:10.1016/s0031-9384(02)00700-x

Cooper, M., Perchonok, M., and Douglas, G. L. (2017). Initial Assessment of the Nutritional Quality of the Space Food System over Three Years of Ambient Storage. *Npj Microgravity* 3 (1), 17. doi:10.1038/s41526-017-0022-z

Coves, D., Gasset, E., Lemarie, G., and Dutto, G. (1998). A Simple Way of Avoiding Feed Wastage in European Seabass, under Self-Feeding Conditions. *Aquat. Living Resour.* 11 (6), 395–401. doi:10.1016/s0990-7440(99)80005-9

Dartsch, P. C. (2008). Antioxidant Potential of selectedSpirulina Platensis Preparations. *Phytother. Res.* 22 (5), 627–633. doi:10.1002/ptr.2310

de Vera, J.-P., Alawi, M., Backhaus, T., Baqué, M., Billi, D., Böttger, U., et al. (2019). Limits of Life and the Habitability of Mars: The ESA Space Experiment BIOMEX on the ISS. *Astrobiology* 19 (2), 145–157. doi:10.1089/ast.2018.1897

Di-Poi, C., Beauchaud, M., Bouchut, C., Dutto, G., Covès, D., and Attia, J. (2008). Effects of High Food-Demand Fish Removal in Groups of Juvenile Sea Bass (Dicentrarchus labrax). *Can. J. Zool.* 86 (9), 1015–1023. doi:10.1139/z08-077

Dourou, M., Tsolcha, O. N., Tekerlekopoulou, A. G., Bokas, D., and Aggelis, G. (2018). Fish Farm Effluents Are Suitable Growth media for Nannochloropsis Gaditana , a Polyunsaturated Fatty Acid Producing Microalga. *Eng. Life Sci.* 18 (11), 851–860. doi:10.1002/elsc.201800064

Drayer, G. E., and Howard, A. M. (2014). Modeling and Simulation of an Aquatic Habitat for Bioregenerative Life Support Research. *Acta Astronautica* 93, 138–147. doi:10.1016/j.actaastro.2013.07.013

Dubois, A. B., Cavagna, G. A., and Fox, R. S. (1976). LOCOMOTION OF BLUEFISH. *J. Exp. Zool.* 195 (2), 223–235. doi:10.1002/jez.1401950207

El-Nakhel, C., Giordano, M., Pannico, A., Carillo, P., Fusco, G. M., Pascale, S., et al. (2019). Cultivar-Specific Performance and Qualitative Descriptors for Butterhead Salanova Lettuce Produced in Closed Soilless Cultivation as a Candidate Salad Crop for Human Life Support in Space. *Life* 9 (3), 61. doi:10.3390/life9030061

Flores, G. H., Hernandez, L. H. H., Araiza, M. A. F., and Lopez, O. A. (2012). Effects of Total Replacement of Fishmeal with Spirulina Powder and Soybean Meal on Juvenile Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum). *Israeli J. Aquaculture-Bamidgeh* 64, 790.

Fry, J. P., Mailloux, N. A., Love, D. C., Milli, M. C., and Cao, L. (2018). Feed Conversion Efficiency in Aquaculture: Do We Measure it Correctly? *Environ. Res. Lett.* 13 (2), 024017. doi:10.1088/1748-9326/aaa273

Fuma, S., Une, Y., Ihara, S., Matsui, K., Kudo, T., Tokiwa, T., et al. (2014). Effects of Chronic γ-irradiation on Growth and Survival of the Tohoku Hynobiid Salamander, Hynobius Lichenatus. *J. Environ. Radioactivity* 135, 84–92. doi:10.1016/j.jenvrad.2014.04.001

Gagnaire, B., Cavalié, I., Pereira, S., Floriani, M., Dubourg, N., Camilleri, V., et al. (2015). External Gamma Irradiation-Induced Effects in Early-Life Stages of Zebrafish, Danio rerio. *Aquat. Toxicol.* 169, 69–78. doi:10.1016/j.aquatox.2015.10.005

Galasso, H. L., Lefebvre, S., Aliaume, C., Sadoul, B., and Callier, M. D. (2020). Using the Dynamic Energy Budget Theory to Evaluate the Bioremediation Potential of the Polychaete Hediste Diversicolor in an Integrated Multi-Trophic Aquaculture System. *Ecol. Model.* 437, 109296. doi:10.1016/j.ecolmodel.2020.109296

Galès, A., Triplet, S., Geoffroy, T., Roques, C., Carré, C., Le Floc'h, E., et al. (2020). Control of the pH for marine Microalgae Polycultures: A Key point for CO2 Fixation Improvement in Intensive Cultures. *J. Co2 Utilization* 38, 187–193. doi:10.1016/j.jcou.2020.01.019

Ganuza, E., Benítez-Santana, T., Atalah, E., Vega-Orellana, O., Ganga, R., and Izquierdo, M. S. (2008). Crypthecodinium Cohnii and Schizochytrium Sp. As Potential Substitutes to Fisheries-Derived Oils from Seabream (*Sparus aurata*) Microdiets. *Aquaculture* 277 (1-2), 109–116. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.02.005

Gonzales, J. M. (2009). Aquaculture in Bio-Regenerative Life Support Systems (BLSS): Considerations. *Adv. Space Res.* 43 (8), 1250–1255. doi:10.1016/j.asr.2009.01.034

Gonzales, J. M., and Brown, P. B. (2007). Nutrient Retention Capabilities of Nile tilapia (Oreochromis niloticus) Fed Bio-Regenerative Life Support System (BLSS) Waste Residues. *Adv. Space Res.* 40 (11), 1725–1734. doi:10.1016/j.asr.2007.06.034

Gregory, M. K., Collins, R. O., Tocher, D. R., James, M. J., and Turchini, G. M. (2016). Nutritional Regulation of Long-Chain PUFA Biosynthetic Genes in Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Br. J. Nutr.* 115 (10), 1721–1729. doi:10.1017/s0007114516000830

Gretebeck, R. J., Siconolfi, S. F., Rice, B., and Lane, H. W. (1994). Physical Performance Is Maintained in Women Consuming Only Foods Used on the U.S. Space Shuttle. *Aviat Space Environ. Med.* 65 (11), 1036–1040.

Guo, Z., Phooi, W. B. A., Lim, Z. J., and Tong, Y. W. (2015). Control of CO2 Input Conditions during Outdoor Culture of Chlorella Vulgaris in Bubble Column Photobioreactors. *Bioresour. Technol.* 186, 238–245. doi:10.1016/j.biortech.2015.03.065

Häder, D.-P., Richter, P. R., Strauch, S. M., and Schuster, M. (2006). Aquacells - Flagellates under Long-Term Microgravity and Potential Usage for Life Support Systems. *Microgravity Sci. Technol.* 18 (3-4), 210–214. doi:10.1007/bf02870411

Handeland, S. O., Imsland, A. K., and Stefansson, S. O. (2008). The Effect of Temperature and Fish Size on Growth, Feed Intake, Food Conversion Efficiency and Stomach Evacuation Rate of Atlantic salmon post-smolts. *Aquaculture* 283 (1-4), 36–42. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.06.042

Hanson, J. (1983). Ecology, Aquaculture and Space Colonies. *Proc. OCEANS* 83, 998–1001. doi:10.1109/OCEANS.1983.1152020

Hoffman, R. B., Salinas, G. A., and Baky, A. A. (1977). Behavioral Analyses of Killifish Exposed to Weightlessness in Apollo-Soyuz Test Project Aviation. *Space Environ. Med.* 48 (8), 712–717.

Honda, Y., Honda, S., Narici, M., and Szewczyk, N. J. (2014). Spaceflight and Ageing: Reflecting onCaenorhabditis Elegansin Space. *Gerontology* 60 (2), 138–142. doi:10.1159/000354772

Ibsch, M., Anken, R. H., and Rahmann, H. (2000). Weightlessness during Spaceflight Results in Enhanced Synapse Formation in a Fish Brain Vestibular Nucleus. *Neurosci. Lett.* 296 (1), 13–16. doi:10.1016/s0304-3940(00)01594-9

Ijiri, K. (1998). Development of Space-Fertilized Eggs and Formation of Primordial Germ Cells in the Embryos of Medaka Fish. *Adv. Space Res.* 21 (8), 1155–1158. doi:10.1016/s0273-1177(97)00205-6

Ijiri, K., Mizuno, R., and Eguchi, H. (2003). "Use of an Otolith-Deficient Mutant in Studies of Fish Behavior in Microgravity," in *Space Life Sciences: Gravitational Biology: 2002*. Editors L. L. Bruce, K. Ijiri, and G. Perbal, 32, 1501–1512. doi:10.1016/s0273-1177(03)90388-7

Ishimatsu, A., Hayashi, M., and Kikkawa, T. (2008). Fishes in high-CO2, Acidified Oceans. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 373, 295–302. doi:10.3354/meps07823

Kalousová, K., Souček, O., Tobie, G., Choblet, G., and Čadek, O. (2016). Water Generation and Transport below Europa's Strike-Slip Faults. *J. Geophys. Res. Planets* 121 (12), 2444–2462. doi:10.1002/2016je005188

Khodadad, C. L. M., Hummerick, M. E., Spencer, L. E., Dixit, A. R., Richards, J. T., Romeyn, M. W., et al. (2020). Microbiological and Nutritional Analysis of Lettuce Crops Grown on the International Space Station. *Front. Plant Sci.* 11, 199. doi:10.3389/fpls.2020.00199

Kicklighter, C., Kubanek, J., Barsby, T., and Hay, M. (2003). Palatability and Defense of Some Tropical Infaunal Worms: Alkylpyrrole Sulfamates as Deterrents to Fish Feeding. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 263, 299–306. doi:10.3354/meps263299

Kiron, V., Phromkunthong, W., Huntley, M., Archibald, I., and Scheemaker, G. (2012). Marine Microalgae from Biorefinery as a Potential Feed Protein Source for Atlantic salmon, Common Carp and Whiteleg Shrimp. *Aquacult. Nutr.* 18 (5), 521–531. doi:10.1111/j.1365-2095.2011.00923.x

Kiss, J. Z. (2014). Plant Biology in Reduced Gravity on the Moon and Mars. *Plant Biol. J.* 16, 12–17. doi:10.1111/plb.12031

König, B., Dünne, M., and Slenzka, K. (2001). "Earth Life Support for Aquatic Organisms, System and Technical Aspects," in *Space Life Sciences: Closed Ecological Systems: Earth and Space Applications*. Editor M. Nelson, 27, 1523–1528. doi:10.1016/s0273-1177(01)00259-9

Koutnik, A. P., Favre, M. E., Noboa, K., Sanchez-Gonzalez, M. A., Moss, S. E., Goubran, B., et al. (2021). Human Adaptations to Multiday Saturation on NASA NEEMO. *Front. Physiol.* 11. doi:10.3389/fphys.2020.610000

Lasseur, C., Verstraete, W., Gros, J. B., Dubertret, G., and Rogalla, F. (1996). "MELISSA: A Potential experiment for a Precursor mission to the Moon," in *Missions to the Moon and Exploring the Cold Universe*. Editors B. H. Foing, R. H. Manka, and D. Lemke, 18, 111–117. doi:10.1016/0273-1177(96)00097-x

Leys, N., Baatout, S., Rosier, C., Dams, A., s'Heeren, C., Wattiez, R., et al. (2009). The Response of Cupriavidus Metallidurans CH34 to Spaceflight in the International Space Station. *Antonie van Leeuwenhoek* 96 (2), 227–245. doi:10.1007/s10482-009-9360-5

Li, M., Callier, M. D., Blancheton, J.-P., Galès, A., Nahon, S., Triplet, S., et al. (2019). Bioremediation of Fishpond Effluent and Production of Microalgae for an Oyster Farm in an Innovative Recirculating Integrated Multi-Trophic Aquaculture System. *Aquaculture* 504, 314–325. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.02.013

Liu, H., Yu, C. Y., Manukovsky, N. S., Kovalev, V. S., Gurevich, Y. L., and Wang, J. (2008). A Conceptual Configuration of the Lunar Base Bioregenerative Life Support System Including Soil-like Substrate for Growing Plants. *Adv. Space Res.* 42 (6), 1080–1088. doi:10.1016/j.asr.2008.03.020

Liu, L.-g. (2019). Origin and Early Evolution of Terrestrial Planet Atmospheres and Oceans. *Terr. Atmos. Ocean. Sci.* 30 (6), 765–770. doi:10.3319/tao.2019.05.08.01

Lychakov, D. V. (2016). Behavioural and Functional Vestibular Disorders after Space Flight: 2. Fish, Amphibians and Birds. *J. Evol. Biochem. Phys.* 52 (1), 1–16. doi:10.1134/s0022093016010014

Marques, R., Bouvier, C., Darnaude, A. M., Molinero, J.-C., Przybyla, C., Soriano, S., et al. (2016). Jellyfish as an Alternative Source of Food for Opportunistic Fishes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 485, 1–7. doi:10.1016/j.jembe.2016.08.008

McCubbin, F. M., and Barnes, J. J. (2019). Origin and Abundances of H2O in the Terrestrial Planets, Moon, and Asteroids. *Earth Planet. Sci. Lett.* 526, 115771. doi:10.1016/j.epsl.2019.115771

Mladineo, I., Bočina, I., Przybyla, C., Fievet, J., and Blancheton, J.-P. (2010). Fish Growth and Health Aspects of Sea Bass (Dicentrarchus labrax) Reared in Standard vs. High Rate Algal Pond Recirculation Systems. *Aquat. Living Resour.* 23 (2), 217–224. doi:10.1051/alr/2010013

Morais, S., Mourente, G., Martínez, A., Gras, N., and Tocher, D. R. (2015). Docosahexaenoic Acid Biosynthesis via Fatty Acyl Elongase and Δ4-desaturase and its Modulation by Dietary Lipid Level and Fatty Acid Composition in a marine Vertebrate. *Biochim. Biophys. Acta (Bba) - Mol. Cel Biol. Lipids* 1851 (5), 588–597. doi:10.1016/j.bbalip.2015.01.014

Mori, S., Mitarai, G., Takabayashi, A., Usui, S., Sakakibara, M., Nagatomo, M., et al. (1996). Evidence of Sensory Conflict and Recovery in Carp Exposed to Prolonged Weightlessness. *Aviat Space Environ. Med.* 67 (3), 256–261.

Mori, S., Mitarai, G., Takagi, S., Takabayashi, A., Usui, S., Nakamura, T., et al. (1994). Space experiment Using Large-Sized Fish. *Acta Astronautica* 33, 41–47. doi:10.1016/0094-5765(94)90107-4

Murata, Y., Yasuda, T., Watanabe-Asaka, T., Oda, S., Mantoku, A., Takeyama, K., et al. (2015). Histological and Transcriptomic Analysis of Adult Japanese Medaka Sampled Onboard the International Space Station. *Plos One* 10 (10), e0138799. doi:10.1371/journal.pone.0138799

Niederwieser, T., Kociolek, P., and Klaus, D. (2018). A Review of Algal Research in Space. *Acta Astronautica* 146, 359–367. doi:10.1016/j.actaastro.2018.03.026

Niihori, M., Mogami, Y., Naruse, K., and Baba, S. A. (2004). Development and Swimming Behavior of Medaka Fry in a Spaceflight Aboard the Space Shuttle Columbia (STS-107). *Zoolog. Sci.* 21 (9), 923–931. doi:10.2108/zsj.21.923

Olson, S. L., Jansen, M., and Abbot, D. S. (2020). Oceanographic Considerations for Exoplanet Life Detection. *ApJ* 895 (1), 19. doi:10.3847/1538-4357/ab88c9

Olvera-Novoa, M. A., Domínguez-Cen, L. J., Olivera-Castillo, L., and Martínez-Palacios, C. A. (1998). Effect of the Use of the Microalga Spirulina Maxima as Fish Meal Replacement in Diets for tilapia, Oreochromis mossambicus (Peters), Fry. *Aquacult. Res.* 29 (10), 709–715. doi:10.1046/j.1365-2109.1998.29100709.x

Orosei, R., Lauro, S. E., Pettinelli, E., Cicchetti, A., Coradini, M., Cosciotti, B., et al. (2018). Radar Evidence of Subglacial Liquid Water on Mars. *Science* 361 (6401), eaar7268–493. doi:10.1126/science.aar7268

Pagand, P., Blancheton, J.-P., Lemoalle, J., and Casellas, C. (2000). The Use of High Rate Algal Ponds for the Treatment of marine Effluent from a Recirculating Fish Rearing System. *Aquacult. Res.* 31 (10), 729–736. doi:10.1046/j.1365-2109.2000.00493.x

Palmegiano, G. B., Agradi, E., Forneris, G., Gai, F., Gasco, L., Rigamonti, E., et al. (2005). Spirulina as a Nutrient Source in Diets for Growing sturgeon (Acipenser Baeri). *Aquac. Res.* 36 (2), 188–195. doi:10.1111/j.1365-2109.2005.01209.x

Palmer, P. J., Wang, S., Houlihan, A., and Brock, I. (2014). Nutritional Status of a Nereidid Polychaete Cultured in Sand Filters of Mariculture Wastewater. *Aquacult Nutr.* 20 (6), 675–691. doi:10.1111/anu.12129

Paradiso, R., Buonomo, R., De Micco, V., Aronne, G., Palermo, M., Barbieri, G., et al. (2012). Soybean Cultivar Selection for Bioregenerative Life Support Systems (BLSSs) - Hydroponic Cultivation. *Adv. Space Res.* 50 (11), 1501–1511. doi:10.1016/j.asr.2012.07.025

Perez-Pascual, D., Estelle, J., Dutto, G., Rodde, C., Bernardet, J. F., Marchand, Y., et al. (2020). Growth Performance and Adaptability of European Sea Bass (Dicentrarchus labrax) Gut Microbiota to Alternative Diets Free of Fish Products. *Microorganisms* 8 (9):1346 doi:10.3390/microorganisms8091346

Poughon, L., Farges, B., Dussap, C. G., Godia, F., and Lasseur, C. (2009). Simulation of the MELiSSA Closed Loop System as a Tool to Define its Integration Strategy. *Adv. Space Res.* 44 (12), 1392–1403. doi:10.1016/j.asr.2009.07.021

Praveen Kumar, M. K., Shyama, S. K., Kashif, S., Dubey, S. K., Avelyno, D., Sonaye, B. H., et al. (2017). Effects of Gamma Radiation on the Early Developmental Stages of Zebrafish (Danio rerio). *Ecotoxicol Environ. Saf.* 142, 95–101. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.03.054

Przybyla, C., Fievet, J., Callier, M., and Blancheton, J.-P. (2014). Effect of Dietary Water Content on European Sea Bass (Dicentrarchus labrax) Growth and Disease Resistance. *Aquat. Living Resour.* 27 (2), 73–81. doi:10.1051/alr/2014007

Quinton, R. (1912). *L'eau de mer, milieu organique*. Paris: Masson et Cie. Editeurs. doi:10.5962/bhl.title.16370

Rahmann, H., and Anken, R. H. (2002). "Gravity Related Research with Fishes - Perspectives in Regard to the Upcoming International Space Station, ISS," in *Space Life Sciences: Biological Research and Space Radiation*. Editors K. Ijiri, K. Slenzka, and A. Kronenberg, 30, 697–710. doi:10.1016/s0273-1177(02)00384-8

Sarma, A. P., Petar, P., and Murthy, S. D. S. (2008). Spirulina as a Source of Single Cell Protein. *Vegetos* 21 (1), 35–45.

Sebastian, C., Esseling, K., and Horn, E. (2001). Altered Gravitational Forces Affect the Development of the Static Vestibuloocular Reflex in Fish (Oreochromis mossambicus). *J. Neurobiol.* 46 (1), 59–72. doi:10.1002/1097-4695(200101)46:1<59::aid-neu6>3.0.co;2-x

Simon, O., Massarin, S., Coppin, F., Hinton, T. G., and Gilbin, R. (2011). Investigating the Embryo/larval Toxic and Genotoxic Effects of γ Irradiation on Zebrafish Eggs. *J. Environ. Radioactivity* 102 (11), 1039–1044. doi:10.1016/j.jenvrad.2011.06.004

Stein, T. P. (2001). Nutrition in the Space Station Era. *Nutr. Res. Rev.* 14 (1), 87–118. doi:10.1079/095442201108729150

Stuart, K. R., Barrows, F. T., Silbernagel, C., Alfrey, K., Rotstein, D., and Drawbridge, M. A. (2021). Complete Replacement of Fish Oil and Fish Meal in the Diet of Juvenile California Yellowtail Seriola Dorsalis. *Aquac. Res.* 52 (2), 655–665. doi:10.1111/are.14923

Tacon, A. G. J., Lemos, D., and Metian, M. (2020). Fish for Health: Improved Nutritional Quality of Cultured Fish for Human Consumption. *Rev. Fish. Sci. Aquacult.* 28 (4), 449–458. doi:10.1080/23308249.2020.1762163

Tibaldi, E., Chini Zittelli, G., Parisi, G., Bruno, M., Giorgi, G., Tulli, F., et al. (2015). Growth Performance and Quality Traits of European Sea Bass (D. labrax) Fed Diets Including Increasing Levels of Freeze-Dried Isochrysis Sp. (T-ISO) Biomass as a Source of Protein and N-3 Long Chain PUFA in Partial Substitution of Fish Derivatives. *Aquaculture* 440, 60–68. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.02.002

Tikhomirov, A. A., Ushakova, S. A., Kovaleva, N. P., Lamaze, B., Lobo, M., and Lasseur, C. (2007). Biological Life Support Systems for a Mars mission Planetary Base: Problems and Prospects. *Adv. Space Res.* 40 (11), 1741–1745. doi:10.1016/j.asr.2006.11.009

Tocher, D. R. (2015). Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids and Aquaculture in Perspective. *Aquaculture* 449, 94–107. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.01.010

Trout, O. F., Trout, J., and Bruchey, W. J., Jr. (1969). Water Immersion Reduced-Gravity Simulation. *Hum. Factors* 11 (5), 473–487. doi:10.1177/001872086901100507

Tulli, F., Chini Zittelli, G., Giorgi, G., Poli, B. M., Tibaldi, E., and Tredici, M. R. (2012). Effect of the Inclusion of DriedTetraselmis Suecicaon Growth, Feed Utilization, and Fillet Composition of European Sea Bass Juveniles Fed Organic Diets. *J. Aquat. Food Product. Technol.* 21 (3), 188–197. doi:10.1080/10498850.2012.664803

Verseux, C., Baqué, M., Lehto, K., de Vera, J.-P. P., Rothschild, L. J., and Billi, D. (2016). Sustainable Life Support on Mars - the Potential Roles of Cyanobacteria. *Int. J. Astrobiology* 15 (1), 65–92. doi:10.1017/s147355041500021x

Walker, A. B., and Berlinsky, D. L. (2011). Effects of Partial Replacement of Fish Meal Protein by Microalgae on Growth, Feed Intake, and Body Composition of Atlantic Cod. *North Am. J. Aquacult.* 73 (1), 76–83. doi:10.1080/15222055.2010.549030

Yang, L., Li, H., Liu, T., Zhong, Y., Ji, C., Lu, Q., et al. (2019). Microalgae Biotechnology as an Attempt for Bioregenerative Life Support Systems: Problems and Prospects. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 94 (10), 3039–3048. doi:10.1002/jctb.6159

Zabel, P., Bamsey, M., Schubert, D., and Tajmar, M. (2016). Review and Analysis of over 40 Years of Space Plant Growth Systems. *Life Sci. Space Res.* 10, 1–16. doi:10.1016/j.lssr.2016.06.004

Zeidler, C., Vrakking, V., Bamsey, M., Poulet, L., Zabel, P., Schubert, D., et al. (2017). Greenhouse Module for Space System: A Lunar Greenhouse Design. *Open Agric.* 2 (1), 116–132. doi:10.1515/opag-2017-0011

Conflict of Interest: The author declares that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Przybyla. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Author's personal copy

Aquaculture International
https://doi.org/10.1007/s10499-020-00601-5

European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and meagre (*Argyrosomus regius*) fertilized egg resistance to a spacecraft launcher vibration qualifying test

C. Przybyla[1] · G. Dutto[2] · M. Bernard[3] · B. Rollin[2] · X. Laurand[3] · J. Averseng[4] · E. Gasset[1] · I. Tadadjeu[3] · L. Dusseau[3]

Received: 6 April 2020 / Accepted: 27 August 2020/Published online: 23 September 2020
© Springer Nature Switzerland AG 2020

Abstract
Food autonomy represents an essential challenge for the future Moon Village planned by the European Space Agency. Rearing fish on the moon to provide essential amino acids, omega-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin B_{12} could become a reality using integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). The Lunar Hatch programme's goal is to fertilize farmed fish eggs on Earth that would hatch upon arrival at the lunar base. However, the vibrations from a spacecraft's launch are an unusual situation for fish eggs and may have a negative impact on them. European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and meagre (*Argyrosomus regius*) eggs were exposed to mechanical stresses using standard protocol performed to approve a satellite for space launch. The hatching rate was evaluated after vibration expositions at different hours post fertilization (hpf). An initial series of tests subjecting the eggs to orbital rotation demonstrated their integrity. In subsequent tests, mechanical stressors acting on the Soyuz spacecraft was simulated to test impact on fish eggs. The results showed egg robustness for European sea bass at 35 hpf (one-third of the embryo development) and 83 hpf (two thirds) and of meagre at 14 hpf (one third), with no significant difference in hatching rate compared with an unshaken control batch. European sea bass embryos and potentially other fish species with similar incubation periods (4–6 days) seem to be good candidates to surviving a spacecraft launch. This paper discusses the findings and suggests possible future research avenues.

Keywords Aquaculture · Space flight · Fish eggs · Embryogenesis · Food autonomy · Biological life support system · Moon

✉ C. Przybyla
cyrille.przybyla@ifremer.fr

Extended author information available on the last page of the article

Author's personal copy

Introduction

In recent years, several space agencies have begun ambitious projects to establish a long-term manned base on the Moon. Regardless of which solution is selected, one of the main challenges for a lunar outpost will be food autonomy. Launching a cargo of fresh or lyophilized food into space daily is not a viable option from a technical or economic point of view. One answer lies in developing a bioregenerative life support system (BLSS) that includes a waste recycling–based food supply.

Most BLSS research has focused on cultivating bacteria (Leys et al. 2009) and photosynthetic organisms in space (Poulet et al. 2016) using a closed loop based on waste recycling, CO_2 removal and oxygen production (Poughon et al. 2009). In earlier studies, a small number of higher plants were tested in space on the Salyut, Mir and International Space Stations (Salisbury and Clark 1996), including lettuce, tomatoes, wheat and soybeans (Zabel et al. 2016). More recently, microalgae, another photosynthetic organism, have been cultivated in BLSS research (Niederwieser et al. 2018a). The green algae *Chlorella vulgaris* in particular seems to be a promising candidate for an aquatic food loop (Niederwieser et al. 2018b). However, food sources based solely on the fruits and vegetables that have been studied for space systems do not cover all human dietary requirements (Lane et al. 2013).

The recent discovery of hydroxyl and forms of water on the Moon has revived the idea of space aquaculture (Mitrofanov et al. 2016; Nurge 2012; Siegler et al. 2015). Aquatic organisms could help to fill this gap. Fish could provide adequate amino acids to decrease muscle loss on long-duration flights (Stein and Blanc 2011) and supply important lipids such as omega-3 fatty acids, including EPA and DHA (Arthur 2009), which are vital compounds for human cerebral functions (Ghasemi Fard et al. 2019). Another advantage—in contrast to farmed poultry and mammals, for example—is that aquatic organisms are protected by water, which is an intrinsic radiation shield. A water layer can mitigate the effects of charged particles (Baiocco et al. 2018); one study has shown that a human spacesuit made only of water can reduce exposure to solar protons by as much as 50% (Vuolo et al. 2017). Additionally, due to their physiology, fish require five to twenty times less energy than mammals, around three times less oxygen, and generate less carbon dioxide emissions (Gonzales 2009). Lastly, the feed conversion ratio of aquatic organisms is better than that of terrestrially farmed animals (Tacon and Metian 2008; Zuidhof et al. 2014), so relying on the latter would limit food production and autonomy on a future lunar base.

Space multi-trophic aquaculture potential

By exploring the possibilities of synergy between ecological research in a closed system developed on Earth and the challenges of the solar system exploration, integrated aquaculture seems to offer a stimulating subject which can also have practical rewards in the short term (Hanson 1983). For all these reasons, fish aquaculture in space, in addition to cultivating photosynthetic organisms, could be a valuable source of fresh food for lunar crews. In the framework of sustainable aquaculture on Earth, these two types of food production are already considered complementary (Brown et al. 2011; Li et al. 2019; Mladineo et al. 2010). Researchers are studying trophic cascades that reuse fish effluent (nutrients excreted from fish) to feed cultured microalgae. The algae in turn play a role in water depuration and can be a feed source for farmed fish (Dallaire et al. 2007; Tulli et al. 2012). This produces a semi-closed loop in which the by-products from one aquatic system are used as the inputs for another,

Author's personal copy

called an integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) system. While advanced research has been done on cultivating higher plants in space, fish cultivation in space (Blum et al. 1995) could be deepened with current IMTA knowledge gathered on Earth, which has shown that feeding fish with fresh, moist food (i.e. wet algae) does not alter fish growth performance and stimulates immune response (Przybyla et al. 2014). Theoretically, fish could be partially fed using fresh microalgae cultivated in space.

The aim of the Lunar Hatch programme is to develop a method to send embryonated fish eggs in space and to programme their hatching in an IMTA system on the Moon. There, the larvae and fish will be reared until they reach an appropriate weight for human consumption. The choice of eggs as the biological stage for a spaceflight has a number of advantages. A low volume of water is required for egg incubation, so the initial payload could be less than 1 kg for 900 future adult fish. Egg density in the water column is around one egg per millilitre and depends on the fish species. Unlike the larval or adult stages, the embryogenesis phase is suitable for a space flight because embryo development does not require human intervention for several days (the timing also depends on the species). This would allow either long manned spaceflights with no need for maintenance of the eggs or simply sending them on unmanned spacecraft as cargo.

Eggs in space

If study on vertebrate embryos in space is poorly documented, very few studies on fertilized fish eggs in conditions of microgravity and data using aquaculture fish eggs are available.

In 1973, the Skylab 3 mission boarded 50 fertilized eggs of the mud minnow (*Fundulus heteroclitus*), a small saltmarsh fish, as well as several juvenile specimens. Astronauts found 48 larvae from this wild species, by their third week on the space station, a hatching rate of 96% (Johnson 2016).

In February 1979, the first avian eggs (Japanese quail) were boarded onto Soyuz 32 to join the Inkubator-1 module on the Russian space station Salyut 6. The aim was to study the impacts of zero-gravity environments on the development of embryos—and on the lifecycle as a whole—in the framework of finding prospective food sources for future cosmonauts. While the quail eggs hatched on Salyut 6, the development of the quail embryos progressed more slowly than in a terrestrial context, and after hatching, some quail chicks were acephalous. Later, vital organs were also studied on boarded embryos on the MIR station (Barrett et al. 2000).

In 1994, aboard a space shuttle in the International Microgravity Laboratory (IML-2), 43 eggs of the medaka (*Oryzias latipes*), an ornamental fish, were fertilized in space, from which 8 fry hatched. The unhatched eggs were then sent back to Earth, and a further 30 fry hatched within 3 days of landing (Ijiri 1998).

In 2007, the Biorisk experiment exposed fresh water killifish (*Nothobranchius guentheri*) eggs to the outer side of the Russian Segment of the International Space Station (ISS) for 1 month. This species is an ornamental fish with the unusual characteristic that it produces eggs that incubate in dry conditions. Unfortunately, the extreme heat deformed the plastic petri dishes and the samples kept in cotton bags were unexploited (Baranov 2009).

As a precondition to planning a BLSS that integrates IMTA for the moon station, several biological questions have to be studied concerning the aquatic organism's trip to reach the moon base. This paper focuses on the first effects applied to fish embryos during the space launch phase: the mechanical and acoustic vibrations.

Author's personal copy

The experimental fish species choice

To date, several space missions have tracked water presence on the Moon and Mars. The water quality is not clearly known. Recent discoveries have reported the presence of water on the moon in the form of ice or hydroxyls in the lunar regolith (Basilevsky et al. 2012). The next lunar missions will prospect for ice water or underground water probably mineralized by geologic processes. The diversity of fish species allows two possible candidates: fresh or saltwater species. If water is produced by hydroxyl combination, then freshwater aquaculture species are good candidates (Gonzales and Brown 2006). If moon water or moon ice is mineralized due to geological and chemical interactions over several billions of years, or wasted salt water from the hydrogen extraction process (electrolysis) can be reused, osmoregulating aquaculture fish (the marine profile) would be the best candidates. Authors made the choice to study marine fish, with the idea that the solar system provides at least an example of a celestial body with a high quantity of mineralized water …the Earth. It might be possible elsewhere.

The United Nation Food and Agriculture Organization lists 360 fish species used for aquaculture around the world (FAO 2018). A preliminary study based on a bibliographic work has selected around 22 aquaculture fish potentially as candidates (marine, brackish and fresh water) for a moon flight, focussing on the knowledge of its embryonic stage oxygen needs, carbon dioxide production, embryogenesis duration and charged particle resistance (publication in preparation). The European sea bass (*Dicentrachus labrax*) appears in this list with other marine and freshwater fish.

The meagre (*Argyrosomus regius*) has an embryonic development three times faster than the European sea bass. It is an excellent biologic support for evaluating if a relationship exists between embryo development speed and resistance to vibration exposure.

Our project (Launch Vibrations on Fish Embryos LAUVE) investigated the influence of launcher vibrations on the embryogenesis of two fish species that are widely used in aquaculture, with two different egg development strategies: the European sea bass and the meagre.

As well as testing the influence of launcher vibrations, we also sought to determine which embryo stage would be most able to withstand these vibrations. This was defined by the hours post fertilization (hpf) of the egg.

A preliminary experiment was conducted in which European sea bass eggs were shaken in orbital rotation to evaluate their behaviour in response to an unusual intense vibration. These experiments also helped to validate the design of the experimental module for the subsequent experiment. In the second experiment, triplicate samples of European sea bass and meagre eggs at different hours post fertilization were subjected to a simulated Soyuz takeoff using the classical protocol for satellite qualification for space launch.

Materials and methods

Experimental tank

For the experiment, the Ifremer team designed a closed, impervious experimental tank to be inserted in the CubeSat nanosatellite. Called the LAUVE CubeSat (LCS), the tank was made from polyvinyl chloride and could hold 230 ml of seawater. To avoid destructive shocks from the eggs hitting the tank walls, the interior has no angles and has a shape similar to a half-sphere (Fig. 1). The LCS tank diameter was 6.4 cm, with a full weight of 639 g when carrying the payload of 230 ml of water and 200 eggs (Fig. 2). The entire volume of the LCS was filled

Author's personal copy

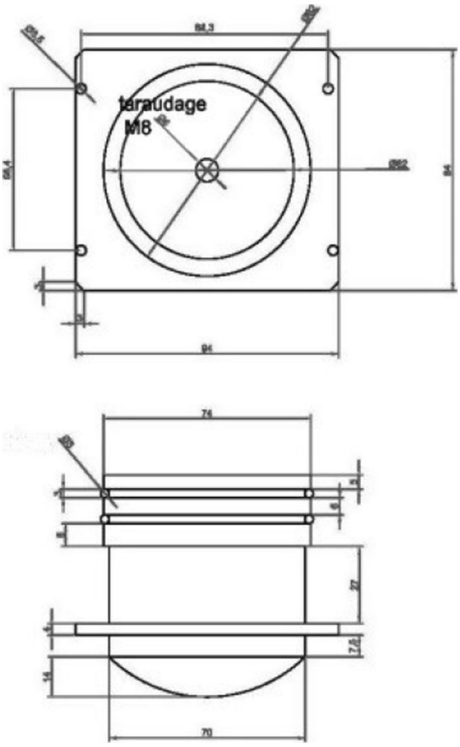


Fig. 1 Lauve CubeSat (LCS) cross section

with seawater. Particular attention was given to avoid a gaseous bubble of air above the water, as wave movement inside the LCS module during vibration tests was liable to degas the dissolved oxygen from the water column, thus jeopardizing egg survival.

Biological material

For the preliminary orbital rotation experiment, eggs were produced at the Ifremer aquaculture station (in Palavas-les-Flots, France) from European sea bass brood stock. Until the vibration tests, 2000 floating eggs from a controlled spawn and fertilization were isolated in a recirculating aquaculture system (RAS) with seawater maintained at 15.0 °C.

For the subsequent Soyuz mechanical tests, the European sea bass and meagre eggs came from a natural spawn at a local fish farm close to the Ifremer laboratory. Spawn was maintained in an RAS at around 13.0 °C for the European sea bass eggs ($n = 2000$) and at 18.0 °C for the meagre eggs ($n = 2000$) before selection for the experiment.

Egg sample preparation

Fertilized eggs of the European sea bass and the meagre are transparent. The first cellular divisions and the start of the embryo form are easily visible without a clarifier agent. Due to the possibility of the presence of unfertilized eggs (size 1 mm), or eggs

Author's personal copy

that stopped cellular division in the spawn, a volume of eggs were sampled from the incubator for fertilization evaluation using a binocular microscope (Motic-w10x20) and a small grid tank originally used for algae or zooplankton counting. Only eggs with an embryo primary form along the chorion (a dark curved shadow) were chosen for the experiment in order to be sure viable embryonated eggs were selected, insuring the robustness of the sample. Thus, the earliest embryonic stage tested in the study was after 30 hpf for the European sea bass and 14 hpf for the meagre which represent one-third of the development of the two species. Parameters and water conditions for the different experiments are presented in Table 1.

Orbital rotation experiment

The aim of the orbital rotation test was both to validate the design of the LSC experimental module and to test the eggs' capacity to withstand harsh vibration stress at different embryonic stages. The egg samples at 56 hpf and 71 hpf ($n = 200$) were manually counted and embryo presence was checked visually. As in the previous protocol, all selected eggs from the experimental samples were embryonated. Two samples were placed in 250-ml glass beakers (filled to 230 ml) and the third sample was locked in the LCS (230 ml). An orbital shaker (Edmund Bühler KS-15) applied 250 rpm for 15 min on the LCS and one of the beakers firmly attached to the device. The non-shaken glass beaker (used as a control) was placed far from the trial site to avoid possible vibrations. After the rotation phase, the three samples were individually placed in aerated 230-ml glass beakers and left to float in a cylinder-conical incubator at 14.6 ± 1.8 °C with a salinity level of 37.8 PSU until the end of embryonic development and hatching.

Soyuz mechanical test

The Soyuz launch system was selected because this launcher model is used for classical testing to qualify satellites and microsatellites for space flight. Vibration levels will never



Fig. 2 The Lauve CubeSat (LCS) experimental module

Author's personal copy

be higher than Soyuz. The objective of the simulation was to apply random vibrations, imitating reality. Originally, this vibration test is required for boarded electronics on a space mission. The experiment originality is that boarded devices and machines were replaced by fertilized eggs which will undergo the same qualification test. A vibration exciter (B&K 4801 + 4812) from the University of Montpellier's Laboratory of Mechanics and Civil Engineering was used to mimic launch vibration environments. The SOYUZ-2/FREGAT flight environment was numerically programmed into the vibration exciter and piloted in an open loop using an HP 3562A dynamic signal analyser with one signal for generation and two for measurement. A metallic box was specially designed to hold the LCS module. Accelerations were recorded using microprobes applied to the top and the centre of the box containing the LCS. Before each round, the vibration exciter was calibrated. Random vibration accelerations were divided into two launch phases: a first phase of 120 s corresponding to the launcher boosters' mechanical vibrations at ignition and lift-off (acceleration power density: $0.02g^2$/Hz on a 20–300-Hz band), and a second phase of 480 s in which acoustic waves appear due to the increased speed of the launcher (acceleration power density: $0.05g^2$/Hz on a 100–1000-Hz band). The frequency and spectral density of vibrations at qualification levels are described in Table 2. After 600 s, the spaceship was considered in low orbit (Kàrmàn line around 100 km), thruster action decreased and acoustic vibrations stopped. The total time for a complete experiment (set, calibration, test, dismantling) was around 1 h for the entire triplicate.

Egg samples in the Soyuz experiment

As in the initial orbital rotation experiment, the samples for the Soyuz test were in triplicate ($n = 200$/LCS), with the eggs counted manually and the embryo presence checked visually. For the European sea bass, two embryo stages were tested at 35 hpf and 83 hpf. The incubation water temperature in the European sea bass experiment was 13.1 °C, while in the meagre experiment, it was 18.0 °C. The higher temperature for the meagre was due to the specific comfort zone for this species. These temperatures are commonly applied in industrial

Table 1 Embryonic stage exposed and environmental parameters along the experimentation (*NA*, not available)

		European seabass				Meagre
		Orbital rotation 250 t/mn		Soyuz qualification test		
	Embryonic stage exposed (hpf)	56	71	35	83	14
	Percentage of embryo development	60%	76%	32%	75%	38%
	Vibration duration (s)	600	600	600	600	600
Spawning tank	Water temperature (°C)	$15.0^{\pm0.2}$	$14.9^{\pm0.2}$	$13.2^{\pm0.1}$	$13.0^{\pm0.4}$	$13.1^{\pm0.1}$
LAUVE Cube-Sat (LCS) Module	Water temperature (°C)	14.8	14.6	13.6	13.4	18
	Water oxygen concentration ($mg.L^{-1}$)	7.9	NA	21.5	27.5	15.0
	Water oxygen (% saturation)	99	NA	260	335	< 200
Incubator	Water temperature (°C)	$14.6^{\pm1.8}$	15	13.2	13.3	18
	Water salinity (PSU)	37.8	37.8	37.8	37.7	37.6
	Hatching time (hpf)	94	94	110	110	37

Author's personal copy

aquaculture (Mylonas et al. 2013). As the testing facility was located 17 km from the marine biology station (around 30 min by car), both triplicates (LCS and control) were transported by car to ensure the same handling constraints. The simulation experiment was carried out only on LCS samples, not on the control. After vibration exposition LCS and control triplicates went back into a classical incubator in RAS. The experimental design is summarized in Fig. 3. A short previous experiment showed that the oxygen quantity dissolved into a 230-ml closed volume was sufficient for 200 eggs' physiology for a residence time in the LCS module less than 8 h. For the Soyuz experiment, embryos were closed for around 3 hours.

Hatching rate evaluation

For both the orbital rotation and spatial qualification tests, the hatching evaluation protocol was the same. For both species, after the theoretical date of hatching, each sample was filtered with a 700-μm mesh and visually analyzed to detect young larvae using the same binocular microscope described previously. For the orbital rotation experiment, the number of live larvae was recorded and results were given in the percentage of live larvae:

$$\text{Hatching rate}\ (\%) = \frac{\text{Live larvae}}{\text{Sample size}}$$

The orbital experiment showed that some embryos considered dead were in fact alive in the egg envelope but unhatched. Thus, other biological information in addition to live larvae was collected in the Soyuz experiment. Eggs were identified as dead (embryo development process definitely stopped) by their dark colour, while unhatched eggs were identified by their translucent aspect and the presence of the embryo. This information was recorded for the experiments with European sea bass at 35 hpf and meagre at 14 hpf, and the hatching rate calculation was modified to:

$$\text{Hatching rate}\ (\%) = \frac{\text{Live larvae}}{(\text{Live larvae} + \text{dead} + \text{unhatched})}$$

Statistics

For each test (orbital rotation and Soyuz simulation), the hatching rate as a percentage (p) was converted using $x = \sqrt[2]{\arcsin(p)}$. Transformed data was tested for normality and equal variance. All the dataset profiles allowed the parametric t test to be used.

Table 2 Random vibration parameters for flight qualification levels

Operational phase	Duration (sec)	Frequency sub-band, Hz						Acceleration in g
		20–50	50–100	100–200	200–500	500–1000	1000–2000	
		Spectral density g^2 / Hz						
Vehicle launch	120	0.02	0.02	0.02–0.05	0.05	0.05–0.025	0.025–0.013	7.42
	480	0.02	0.02	0.02	0.02–0.008	0.008–0.004	0.004–0.002	3.54

Author's personal copy

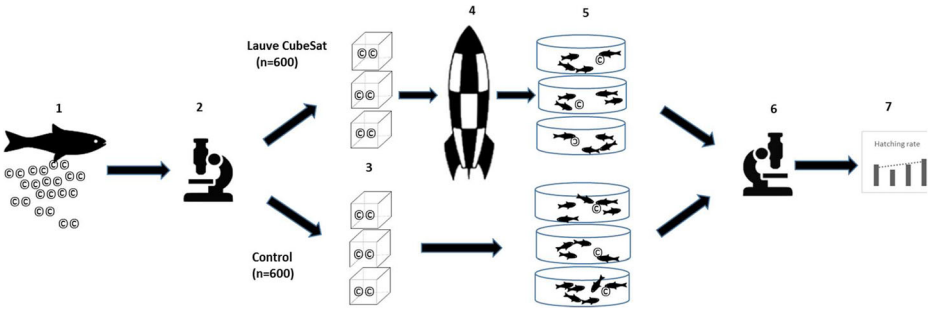


Fig. 3 The experimental design of the Soyuz vibration simulation. (1) Fertilization of 2000 eggs of the studied species. (2) Visual check for embryo presence. (3) Two hundred eggs per module tested in triplicate. (4) LCS submitted to simulated Soyuz mechanical and acoustic vibrations. (5) Standard rearing conditions in tank for all samples until hatching. (6) Visual check for live larvae and dead or unhatched eggs. (7) Evaluation of hatching rate depending on conditions

Results

Orbital rotation

In this test, European sea bass eggs at 56 hpf and 71 hpf were shaken for 15 min at 250 rpm. No leaks were observed in the LCS module. The eggs were in rotation in the rotation direction of the device and were distributed equally in the water column along the wall of the LCS or beaker. The 56-hpf eggs hatched 40 h after the test and the 71-hpf eggs after 22 h, corresponding to a simulated launch at 60% and 76% of embryonic development respectively. When the LCS module was opened, the eggs were in good condition: no egg envelope detritus was observed. After a period of incubation in a standard closed-system aquaculture environment, live larvae were visually counted for each sample: LCS, open beaker and the control. The results are presented in Fig. 4.

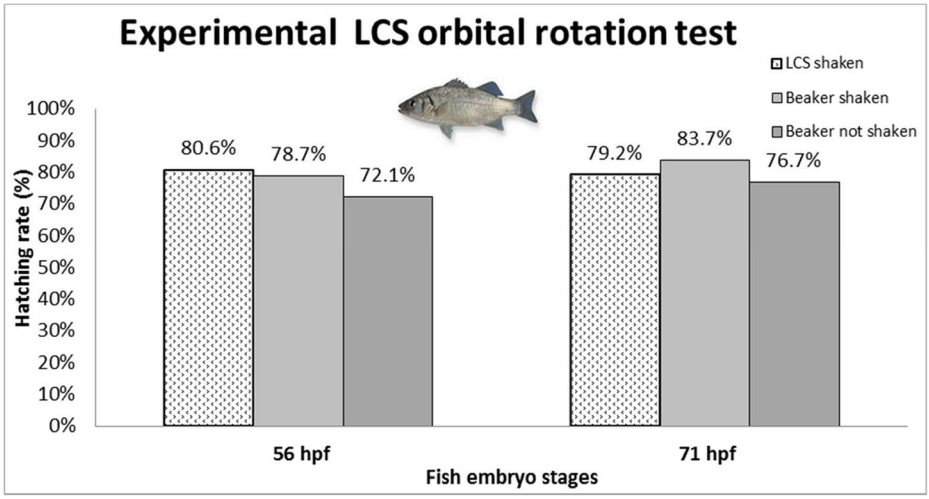


Fig. 4 Pilot study results: European sea bass hatching rate after orbital rotation (250 rpm–10 min) on embryo stages at 56 hpf and 71 hpf. Testing conditions: shaken LCS module, shaken beaker and a beaker control that was not shaken

Author's personal copy

The European sea bass hatching rates were between 72.1 and 83.7% for the three samples. This range can be considered normal, falling in the high range of the hatching rate in commercial conditions. The overall structure of the LCS and its mounting on the CubeSat preserved the eggs' integrity during the multidirectional forces applied in orbital rotation. These positive results allowed us to move on to the Sine-on-Random vibration experiments simulating a Soyuz launch.

Soyuz mechanical test

European sea bass

For European sea bass eggs subjected to vibrations at 35 hpf and 83 hpf, hatching was observed at 110 hpf for both, despite the fact the eggs came from different fertilization batches. As a result, we can retrospectively calculate that launch simulation occurred at 32% and 75% of embryonic development, respectively. Random vibrations did not affect fish egg integrity.

The hatching rate was 75.8% ± 4.0 for samples tested in the LCS and 82.1 ± 3.5 for control samples. In terms of residual biological materials, LCS samples revealed that 21.8% ± 4.4 of the eggs were dead and 2.6% ± 0.5 were unhatched, while in the control samples, 17.5% ± 3.2 of eggs were dead and 1.8% ± 0.7 were unhatched. No significant difference was observed for these parameters.

In the latest embryonic stage (83 hpf), the hatching rate was 92.9% ± 1.8 for LCS samples and 96.7% ± 2.4 for control samples. Respectively, 7.1% ± 1.8 and 4.1% ± 2.0 were considered unhatched eggs (including dead eggs) because visual differentiation was not possible. No significant difference was observed for these parameters. The results are presented in Fig. 5.

Meagre

In meagre, the period of incubation is physiologically shorter than that of European sea bass. For the Soyuz test on eggs at 14 hpf, the hatching time was observed at 37 hpf. At the moment

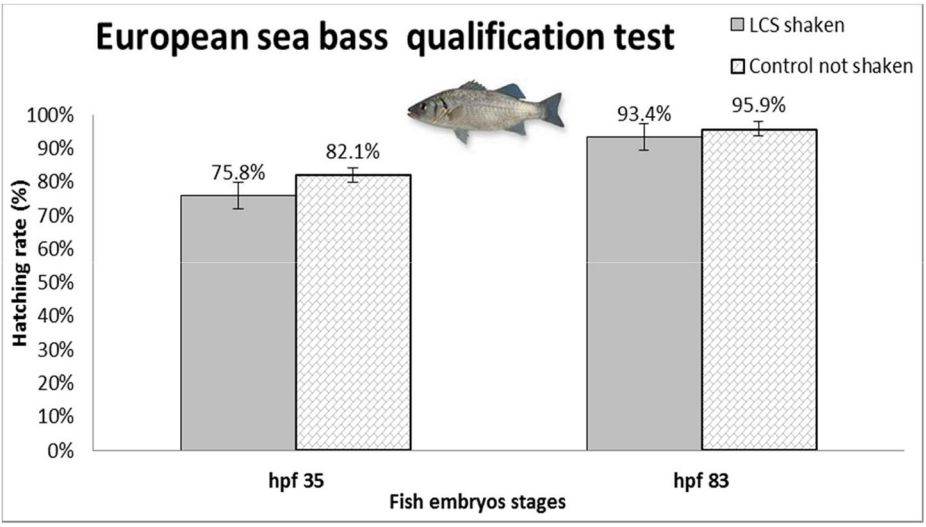


Fig. 5 European sea bass hatching rate after Soyuz launch simulation (standard qualification test—10 min) on embryos at 35 hpf and 83 hpf for the testing conditions in triplicate: shaken LCS module and a control LCS that was not shaken

Author's personal copy

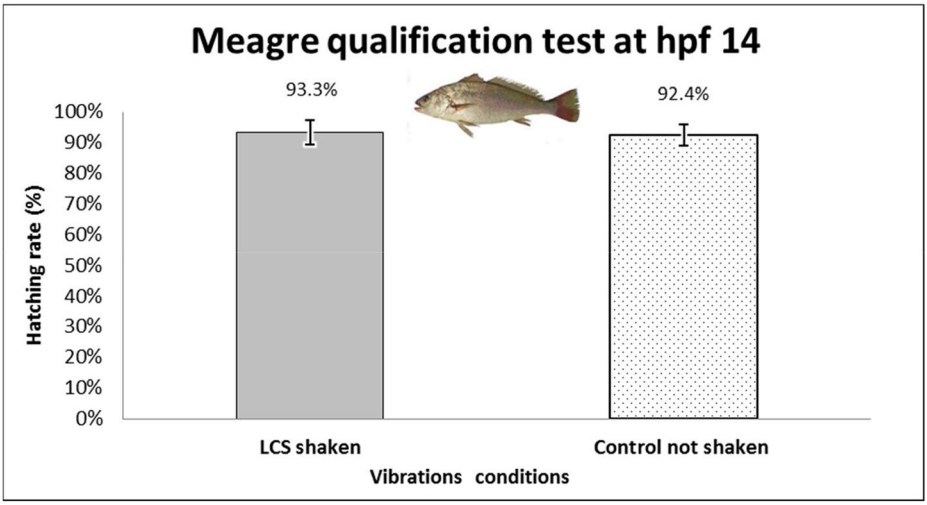


Fig. 6 Meagre hatching rate after Soyuz launch simulation (standard qualification test—10 min) on embryos at 14 hpf for the two testing conditions in triplicate: shaken LCS module and a control LCS that was not shake

of exposure to launch vibrations, the embryonic development was at 38%. The hatching rate is presented in Fig. 6.

The meagre hatching rate was 95.3% ± 6.3 for samples tested in the LCS and 92.4% ± 6.2 for control samples. In terms of residual biological materials, LCS samples revealed that 6.3% ± 4.1 of the eggs were dead and 2.6% ± 0.5 were unhatched, while in the control samples, 6.4% ± 5.2 of the eggs were dead and 1.8% ± 0.8 were unhatched. No significant difference was observed for these parameters.

Discussion

Marine organisms and fish were the first forms of life on Earth in the prehistoric stormy oceans (Quinton 1912). Fish reproductive strategy selected for embryonic eggs capable of surviving turbulent stream forces. Regardless of the species, embryo stage or embryo physiology, our results demonstrated that fish eggs show good robustness to withstanding launcher vibrations. These results could be explained by the natural embryo protection to extreme conditions. In contrary to poultry eggs or mammalian embryos, fish eggs in the open sea are subject to harsh movements in random directions. Fish embryos are protected by the chorion from mechanical stresses such as shocks and acoustic vibrations. The chorion (3–4 μm) is a cellular envelope surrounding the mature eggs of teleost fish and is composed of several protective layers of specific glycol-proteins. This structure plays a role in immunogen production during incubation (Scapigliati et al. 1994) as chorion glycoproteins are synthesized in the genitor's livers (Saavedra et al. 2016). In the context of a space aquaculture programme, brood stock management must stay on the Earth which optimizes brood stock feed quality in the aim of maintaining chorion quality.

The Skylab 3 mission, in 1973 with mud minnow (*Fundulus heteroclitus*), recorded a hatching rate of 96% (Johnson 2016) and 86% on zebrafish (*Orysias latipes*) in the International Microgravity Laboratory mission in 1994 (Ijiri 1998). While the mud minnow and the zebrafish are not aquaculture species, these hatching rates in space are close to the meagre in our study. It confirms

Author's personal copy

that the earlier stage of development is most relevant for a space flight. In contrast to the juvenile fish, fish fry never displayed space sickness behaviour, detected by loop swimming (Baumgarten 1975; Chatani et al. 2015). The absence of space sickness may be associated with the fact that the otoliths are not totally formed during the embryogenesis, so it has a low impact (Chatani et al. 2015; Ijiri et al. 2003). The start of otolith development in space and the protection afforded by the chorion could contribute to an easy acclimation to microgravity during embryo formation.

Our study indicates that European sea bass and meagre hatching rate exposed to launch simulation do not differ from their Earth rates. The hatching rate and the duration of embryogenesis were similar to those observed in commercial farming conditions without launcher vibration stress. On ground-based spaceflight preparation, a key challenge will be to identify the presence of the embryo at an early stage in order to select the most viable possible embryos. In this study, in the earliest stage, we were able to test for both species corresponding to 30% of the total embryo development. The biodiversity of fish involve different reproduction strategies and incubation periods. For a lunar flight, the period of incubation must be set to the trip duration (3 to 6 days depending on the flight plan). Hatching was planned to occur at the BLSS on the moon to avoid human intervention during the flight. Our results showed that European sea bass hatches 110 h after fertilization (4.5 days), which makes this species a potential candidate. Embryos could be placed in hypo physiology in the aim to delay hatching by 1 or 2 days (Soyano and Mushirobira 2018). However, if results of meagre eggs' mechanical resistance make it a potential candidate, the meagre hatches around 37 h after fertilization (1.5 days), so this species would be incompatible for transporting fish solely in their embryo phase. Future studies could investigate which aquaculture fish species would be most relevant to select according to their incubation period (up to 72 hpf). It is also important to consider logistics on the ground, such as boarding duration and the risk of launch window delays (due to aborted countdown, unfavourable weather, etc.) to ensure a margin of safety if there is a time lapse.

Conclusion

There are two substantive conclusions from our study. First of all, two aquaculture species have the capacity to hatch after a simulated spacecraft launch with a comparable ratio to current observations on Earth. Secondly, regardless of the embryonic life stage post third of the development, embryos are resistant to a qualifying test for a spaceflight. However, exposition during early stages post fertilization needs to be tested. These encouraging preliminary results confirm our intuition and hypothesis that aquatic forms can adapt to extreme environments such as outer space. So while our results indicate that the European sea bass and meagre could withstand launch conditions, future experiments have to investigate embryo and larva integrity in a space environment. Such a study should focus on fish embryos' resistance to hypergravity (launcher acceleration) and microgravity adaptation and the acceptable radiation dose for a normal larval development until the first feeding (around 5 days post hatching for European sea bass).

Over the last 50 years, a large amount of knowledge about fish aquaculture has been gathered, and this could be capitalized on as a tool for species selection using selective parameters regarding Moon flight constraints and Moon base fish farming feasibility. Research in this direction could make fish the first reared animal off-Earth in the aim of developing food autonomy in space.

Acknowledgements The Lunar Hatch programme and LAUVE project (2019–2020) are supported by Ifremer. The author would like to sincerely thank Véronique Ribière for her communications consulting expertise, her

Author's personal copy

involvement and her valuable contributions in discussions around the project. A video of the experiment can be viewed at https://www.youtube.com/watch?v=Kwigd9lETmE&feature=youtu.be. In memory of Gilles Futsch (1967–2016), the first supporter of the Lunar Hatch project.

Funding The experiments were auto-financed by the French institute for the exploration of the sea (Ifremer).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All applicable international, national and institutional guidelines for the care and use of fish eggs were followed by the authors.

References

Arthur R (2009) Omega-3 sources. J Complement Med 8:28

Baiocco G et al (2018) A water-filled garment to protect astronauts during interplanetary missions tested on board the ISS. Life Sci Space Res 18:1–11. https://doi.org/10.1016/j.lssr.2018.04.002

Baranov (2009) The Biorisk experiment: 13-month exposure of resting forms of organism on the outer side of the Russian Segment of the International Space Station: preliminary results. Dokl Biol Sci 426:706–709

Barrett JE, Wells DC, Paulsen AQ, Conrad GW (2000) Embryonic quail eye development in microgravity. J Appl Physiol 88:1614–1622

Basilevsky AT, Abdrakhimov AM, Dorofeeva VA (2012) Water and other volatiles on the moon: a review. Sol Syst Res 46:89–107. https://doi.org/10.1134/s0038094612010017

Baumgarten V (1975) Effect of prolonged weightlessness on the swimming pattern of fish aboard Skylab 3. Aviat Sapce Environ Med 46:902–906

Blum V, Andriske M, Kreuzberg K, Schreibman MP (1995) Animal protein production modules in biological life support systems: novel combined aquaculture techniques based on the closed equilibrated biological aquatic system (CEBAS). Acta Astronautica 36:615–623. https://doi.org/10.1016/0094-5765(95)00150-6

Brown N, Eddy S, Plaud S (2011) Utilization of waste from a marine recirculating fish culture system as a feed source for the polychaete worm, *Nereis virens*. Aquaculture 322:177–183. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.017

Chatani M et al (2015) Microgravity promotes osteoclast activity in medaka fish reared at the international space station. Sci Rep 5:14172. https://doi.org/10.1038/srep14172

Dallaire V, Lessard P, Vandenberg G, de la Noue J (2007) Effect of algal incorporation on growth, survival and carcass composition of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fry. Bioresour Technol 98. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.043

FAO (2018) The state of world fisheries and aquaculture 2018- Meeting the sustainable development goals. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy, p 210. http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Accessed 7 Sept 2020

Ghasemi Fard S, Wang FL, Sinclair AJ, Elliott G, Turchini GM (2019) How does high DHA fish oil affect health? A systematic review of evidence. Crit Rev Food Sci Nutr 59:1684–1727. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1425978

Gonzales JM (2009) Aquaculture in bio-regenerative life support systems (BLSS): Considerations. Adv Space Res 43:1250–1255. https://doi.org/10.1016/j.asr.2009.01.034

Gonzales JM, Brown PB (2006) Nile tilapia *Oreochromis niloticus* as a food source in advanced life support systems: Initial considerations. Adv Space Res 38:1132–1137. https://doi.org/10.1016/j.asr.2005.11.002

Hanson J (1983) Ecology, Aquaculture And Space Colonies Proceedings OCEANS '83,San Francisco, CA, pp. 998–1001. https://doi.org/10.1109/OCEANS.1983.1152020

Ijiri K (1998) Development of space-fertilized eggs and formation of primordial germ cells in the embryos of Medaka fish. Adv Space Res 21:1155–1158

Ijiri K, Mizuno R, Eguchi H (2003) Use of an otolith-deficient mutant in studies of fish behavior in microgravity. In: Bruce LL, Ijiri K, Perbal G (eds) Space life sciences: gravitational biology: 2002, vol 32. Advances in Space Research-Series, vol 8. pp. 1501–1512. https://doi.org/10.1016/s0273-1177(03)00623-9

Johnson DS (2016) The first fish in orbit sprinkler/praxis. https://blogs.scientificamerican.com/guest-blog/the-first-fish-in-orbit/. Accessed 7 Sept 2020

Author's personal copy

Lane HW, Bourland C, Barrett A, Heer M, Smith SM (2013) The role of nutritional research in the success of human space flight. Adv Nutr 4:521–523. https://doi.org/10.3945/an.113.004101

Leys N, Baatout S, Rosier C, Dams A, s'Heeren C, Wattiez R, Mergeay M (2009) The response of Cupriavidus metallidurans CH34 to spaceflight in the international space station Antonie Van Leeuwenhoek. Int J Gen Mol Microbiol 96:227–245. https://doi.org/10.1007/s10482-009-9360-5

Li M et al (2019) Bioremediation of fishpond effluent and production of microalgae for an oyster farm in an innovative recirculating integrated multi-trophic aquaculture system. Aquaculture 504:314–325. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.013

Mitrofanov IG, Sanin AB, Litvak ML (2016) Water in the moon's polar areas: results of LEND neutron telescope mapping. Dokl Phys 61:98–101. https://doi.org/10.1134/s1028335816020117

Mladineo I, Bocina I, Przybyla C, Fievet J, Blancheton JP (2010) Fish growth and health aspects of sea bass (Dicentrarchus labrax) reared in standard vs. high rate algal pond recirculation systems. Aquat Living Resour 23:217–224. https://doi.org/10.1051/alr/2010013

Mylonas CC, Mitrizakis N, Castaldo CA, Cervino CP, Papadaki M, Sigelaki I (2013) Reproduction of hatchery-produced meagre Argyrosomus regius in captivity II. Hormonal induction of spawning and monitoring of spawning kinetics, egg production and egg quality. Aquaculture 414:318–327. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.008

Niederwieser T, Kociolek P, Klaus D (2018a) A review of algal research in space. Acta Astronautica 146:359–367. https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2018.03.026

Niederwieser T, Kociolek P, Klaus D (2018b)) Life Sci Space Res 16:8–17. https://doi.org/10.1016/j.lssr.2017.10.002

Nurge MA (2012) In situ dielectric spectroscopy for water detection on the lunar surface. Planet Space Sci 65:76–82. https://doi.org/10.1016/j.pss.2012.01.010

Poughon L, Farges B, Dussap CG, Godia F, Lasseur C (2009) Simulation of the MELiSSA closed loop system as a tool to define its integration strategy. Adv Space Res 44:1392–1403. https://doi.org/10.1016/j.asr.2009.07.021

Poulet L, Fontaine JP, Dussap CG (2016) Plant's response to space environment: a comprehensive review including mechanistic modelling for future space gardeners. Bot Lett 163:337–347. https://doi.org/10.1080/23818107.2016.1194228

Przybyla C, Fievet J, Callier M, Blancheton J-P (2014) Effect of dietary water content on European sea bass (Dicentrarchus labrax) growth and disease resistance. Aquat Living Resour 27:73–81. https://doi.org/10.1051/alr/2014007

Quinton R (1912) L'eau de mer, milieu organique vol Deuxième édition. Masson et Cie. Editeurs, Paris

Saavedra M et al. (2016) Different dietary protein levels affect meagre (Argyrosomus regius) larval survival and muscle cellularity Aquaculture 450:89–94. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.004

Salisbury FB, Clark MAZ (1996) Suggestions for crops grown in controlled ecological life-support systems, based on attractive vegetarian diets. In: MacElroy RD, Kreuzberg K, Nielsen S, Tibbits TW (eds) Natural and artificial ecosystems, vol 18. Advances in Space Research-Series, vol 4/5. pp 33-39. https://doi.org/10.1016/0273-1177(95)00859-d

Scapigliati G, Carcupino M, Taddei AR, Mazzini M (1994) Characterization of the main egg envelope proteins of the sea bass (Dicentrarchus labrax L (teleostea serraniidae) Mol Reprod Dev 38:48–53. https://doi.org/10.1002/mrd.1080380109

Siegler M, Paige D, Williams JP, Bills B (2015) Evolution of lunar polar ice stability. Icarus 255:78–87. https://doi.org/10.1016/j.icarus.2014.09.037

Soyano K, Mushirobira Y (2018) The mechanism of low-temperature tolerance in fish. In: IwayaInoue M, Sakurai M, Uemura M (eds) Survival strategies in extreme cold and desiccation: adaptation mechanisms and their applications, Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1081, pp 149–164. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1244-1_9

Stein TP, Blanc S (2011) Does protein supplementation prevent muscle disuse atrophy and loss of strength? Crit Rev Food Sci Nutr 51:828–834. https://doi.org/10.1080/10408398.2010.482679

Tacon AGJ, Metian M (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. Aquaculture 285:146–158. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.015

Tulli F, Zittelli GC, Giorgi G, Poli BM, Tibaldi E, Tredici MR (2012) Effect of the inclusion of dried Tetraselmis suecica on growth, feed utilization, and fillet composition of European sea bass juveniles fed organic diets. J Aquat Food Product Technol 21:188–197. https://doi.org/10.1080/10498850.2012.664803

Vuolo M et al (2017) Exploring innovative radiation shielding approaches in space: a material and design study for a wearable radiation protection spacesuit. Life Sci Space Res 15:69–78. https://doi.org/10.1016/j.lssr.2017.08.003

Author's personal copy

Zabel P, Bamsey M, Schubert D, Tajmar M (2016) Review and analysis of over 40 years of space plant growth systems. Life Sci Space Res 10:1–16. https://doi.org/10.1016/j.lssr.2016.06.004

Zuidhof MJ, Schneider BL, Carney VL, Korver DR, Robinson FE (2014) Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. Poult Sci 93:2970–2982. https://doi.org/10.3382/ps.2014-04291

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Affiliations

C. Przybyla[1] · G. Dutto[2] · M. Bernard[3] · B. Rollin[2] · X. Laurand[3] · J. Averseng[4] · E. Gasset[1] · I. Tadadjeu[3] · L. Dusseau[3]

[1] MARBEC, CNRS, IFREMER, IRD, Univ. Montpellier, Palavas-les-Flots, France

[2] French Research Institute for Exploitation of the Sea (Ifremer), Laboratoire L-sea, Chemin de Maguelone, Palavas-les-Flots, France

[3] Montpellier University Space Centre (CSUM), University Montpellier, Montpellier, France

[4] Laboratory of Mechanics and Civil Engineering (LMGC) UMR 5508, University Montpellier/CNRS, Montpellier, France

frontiers | Frontiers in Space Technologies

TYPE Original Research
PUBLISHED 09 October 2023
DOI 10.3389/frspt.2023.1240251

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Parag Vaishampayan,
National Aeronautics and Space Administration, United States

REVIEWED BY
Holly Hyde Birdsall,
Baylor College of Medicine, United States
Khaled Y. Kamal,
Texas A&M University, United States

*CORRESPONDENCE
Cyrille Przybyla,
Cyrille.przybyla@ifremer.fr

RECEIVED 14 June 2023
ACCEPTED 18 September 2023
PUBLISHED 09 October 2023

CITATION
Przybyla C, Bonnefoy J, Paounov R, Debiol A, Dutto G, Mansuy E, Lallement S, Coste F, Geffroy B and Frippiat JP (2023), Embryogenesis of an aquaculture fish (*Dicentrarchus labrax*) under simulated altered gravity.
Front. Space Technol. 4:1240251.
doi: 10.3389/frspt.2023.1240251

COPYRIGHT
© 2023 Przybyla, Bonnefoy, Paounov, Debiol, Dutto, Mansuy, Lallement, Coste, Geffroy and Frippiat. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Embryogenesis of an aquaculture fish (*Dicentrarchus labrax*) under simulated altered gravity

Cyrille Przybyla[1]*, Julie Bonnefoy[2], Raphaelle Paounov[1], Amelys Debiol[1], Gilbert Dutto[1], Emmanuel Mansuy[1], Stephane Lallement[1], Florence Coste[2], Benjamin Geffroy[1] and Jean Pol Frippiat[2]

[1]MARBEC, Université de Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD, France, [2]Université de Lorraine, SIMPA, Nancy, France

Food production and balanced nutrition will be a key challenge for residents of a future base on the Moon or Mars. As a complement to photosynthetic organisms, space aquaculture could provide the range of amino acids required to maintain health. This would rely on shipping fertilized aquaculture fish eggs to the Moon. To determine the feasibility of this, this study sought to test the influence of the conditions of a lunar mission—such as hypergravity during rocket launch and microgravity during the journey—on fish embryos and young larvae. To analyze the potential effects of these gravity changes on the early developmental stages of fish, we conducted two experiments to expose them to: i) 10 min of simulated hypergravity at 5 g (launch duration) and ii) 39 h of simulated microgravity using a random positioning machine. Both experiments used European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as a model. We analyzed egg oxygen consumption and hatching rates, as well as the expression of genes related to stress and immunity. The results indicated that neither of these altered gravity conditions affected the hatching rate. Simulated microgravity did not impact fish embryo oxygen consumption and appeared to induce faster embryonic development, as the eggs hatched earlier than expected. Levels of glucocorticoid receptors (GR1 and GR2) and heat shock proteins (Hsp90) were not impacted. Only the levels of complement component protein 3 (C3) were significantly higher in simulated microgravity, while interleukin-1β (IL-1β) transcripts were significantly lower in the hypergravity group, compared to controls. This shows that proteins involved in the innate immune system are expressed under altered gravity. Although further experiments are needed, these results suggest that the European sea bass is a promising candidate for space aquaculture.

KEYWORDS

Complement component 3, European seabass, glucocorticoid receptors, heat shock protein 90, hypergravity, interleukin-1 beta, microgravity, space aquaculture

Abbreviations: hpf, Hours post fertilization; HGE, Hypergravity experiment; SMGE, Simulated microgravity experiment; RPM, Random positioning machine; LEO, Low Earth orbit; RIN, RNA integrity number; 1g, Conventional unit of gravitational acceleration on Earth; BLSS, Bioregenerative life-support system; ECLS, Environmental control and life-support system; GR, Glucocorticoid receptor; GEPAM, Gravitational Experimental Platform for Animal Models; RAS, Recirculating aquaculture system; PSU, Practical salinity unit.

Introduction

The presence of a human community on the Moon or on Mars for long-term residence would require a production unit allowing partial or total food autonomy in addition to cargo deliveries. One of the major objectives of a bioregenerative life-support system (BLSS) is to provide food sources for crewed missions using *in situ* resources and converting waste molecules into food biomass (Przybyla, 2021). The nutritive quality of aquatic organisms (Tacon et al., 2020) makes them prospective candidates to supplement the nutrients supplied by photosynthetic organisms, such as plants (Poulet et al., 2022) or microalgae (Fahrion et al., 2021), which have already been studied in the context of space missions. Resupplying a lunar base from Earth with fresh food on a weekly or monthly basis is neither economically nor technologically feasible. A short-term solution is to provide processed, prepackaged space food. However, lyophilized conservation is unstable, especially concerning essential nutrients such as potassium, calcium, vitamin D, and vitamin K, which are involved in muscle and bone maintenance. The micronutrients most sensitive to storage degradation are vitamins A, C, B1, and B6 after 1 year at ambient temperature (Cooper et al., 2017). A possible nutrition strategy for space bases could be to couple local production of fresh food with supplies brought by cargo spaceships.

Space aquaculture could be planned and integrated into a lunar base's agricultural activities (Przybyla, 2021). Incorporating this activity in addition to greenhouse biomass production or an environmental control and life-support system (ECLS) would increase the level of sustainability over time (Irons and Irons, 2023). The Lunar Hatch program, supported by the French Space Agency (CNES) and the French Institute for Ocean Science (Ifremer), is investigating the feasibility of developing space aquaculture by studying the viability of shipping embryonated fish eggs from the Earth to the Moon. The main growth period of the fish would be on the Moon, where they would be cultivated in a closed circular system until they reached an edible size. This program is experimenting with the European seabass (*Dicentrarchus labrax*) as a model for space aquaculture. Before a real space mission, the feasibility of the concept has to be tested by exposing fish embryos to the environmental changes they would be subjected to during a Moon journey to determine if this affects their development. In the framework of the Lunar Hatch program, a first experiment was performed to study the impact of rocket vibrations on the embryogenesis of the European sea bass and the meagre (*Argyrosomus regius*). The results showed no significant difference on the egg hatching rate for either species after a Soyuz qualifying test, whatever the embryo development stage (Przybyla et al., 2020). Following this rocket vibration experiment, it was decided to perform a second experiment involving altered gravity.

Fish embryos in hypergravity conditions

During a space mission, fish embryos are exposed to two types of altered gravity. The first is hypergravity ($\Delta g > 1$ g) during launcher acceleration. During this 10-min take-off phase, gravity could be $3\ g < \Delta g < 5$ g depending on the thruster power of the launcher. The degree of acceleration varies according to the velocity of the launcher, the fuel burned by the engine, and the mass of the rocket. A study on the larvae of cichlid fish (*Oreochromis mossambicus*) and juveniles of the swordtail (*Xiphophorus hellerii*) looked at fish behavior, neuronal tissue and the otolith in these conditions, finding that fish have hypergravity perception (Brungs et al., 2011). In a permanent 3 g environment, developed fish showed a slight lateral tilt during swimming, probably due to asymmetric otolith growth (Hilbig and Anken, 2017). However, the influence of hypergravity on fish embryo development is poorly documented. In research investigating otolith formation, fertilized zebrafish (*Danio rerio*) eggs were reared at 3 g for 7 days. In the control group, by 16 h post fertilization (hpf) at 1g, precursors of the otoliths were observed. Zebrafish reared at 3 g from 1 to 7 days after fertilization exhibited significantly slower otolith growth than the controls at 1 g (Wiederhold et al., 2003). At 24 hpf, decreased pigmentation was observed when fertilized zebrafish eggs were under 3 g gravity. One day later, the difference with the control batch (1 g) disappeared (Aceto et al., 2015). A study with zebrafish egg and post-larvae under 7 days at 3 g exposure showed changes in their swimming and flotation patterns. Hatching rate showed a significant delay between 2- and 3-day post fertilization. Moreover, long-term hypergravity impacts the gene expression in genes implicated in epigenetic mechanisms (Salazar Moscoso et al., 2022). Medical research has applied long-term hypergravity (several days) to aquarium fish models to better understand vertebrate physiology. However, in a real space mission, this environment lasts only 10 minutes—the time to reach LEO. Therefore, this shorter duration of hypergravity was used for our study.

Fish embryos in microgravity

When $\Delta g < 1$g, organisms are under microgravity. In a space mission, gravity is $10^{-3}\ g < \Delta g < 10^{-5}$ g (Black et al., 1995), whereas on the Moon it is $\Delta g = 0.166$ g. In medical research, larval or juvenile fish have been used as animal models in LEO to investigate the development of the vestibular system and otolith in order to gain a better understanding of the human inner ear (Anken et al., 2016). In this context, ground-based experiments have been conducted to simulate microgravity using a drop tower (Anken and Hilbig, 2009), parabolic flight (Anken et al., 1998; Endo et al., 2002) or a clinostat/rotating wall vessel (Brungs et al., 2011; Edsall and Franz-Odendaal, 2014).

Multicellular life on Earth appeared around two billion years ago. The gravity on Earth is 1g, influencing the phylogenic development of living organisms. Compared to terrestrial vertebrates, aquatic organisms are subject to gravitational force and an opposing buoyancy force. This results in an aquatic organism feeling a reduced body weight compared to a terrestrial organism. This is the reason astronauts train in pools or simulate extravehicular activities in marine environments (Trout and Bruchey, 1969). The aquatic environment suggests that fish embryo development may be less impacted by microgravity than hypergravity in altered gravity conditions.

Determining the feasibility of space aquaculture requires switching from an aquarium fish model to an aquaculture fish model to conduct experiments on their biology in space

(Przybyla, 2021). A journey to the Moon is the first step to verify before planning a potential aquaculture system for a future lunar base. This requires studying embryo/larvae survival rates, behavior and biological status in the conditions experienced during a lunar trip in order to optimize fish welfare.

Glucocorticoid receptors and chaperone heat shock protein Hsp90α

Cortisol, a steroid hormone belonging to the glucocorticoid family, is involved in the regulation of various physiological mechanisms, including inflammation, metabolism and stress response. In fish, as in many other vertebrates, cortisol is considered the main stress hormone (Sadoul and Geffroy, 2019). It binds to glucocorticoid receptors (GRs) and mineralocorticoid receptors to activate or repress a number of genes, contributing to physiological adaptation following stress. The European seabass possesses two glucocorticoid receptors: GR1 and GR2. Expression of genes encoding these proteins has been detected early in an individual's development in the species and used as a stress marker in various studies (Di Bella et al., 2008; Pavlidis et al., 2011; Tsalafouta et al., 2014; Geffroy et al., 2021).

Heat shock proteins are involved in animal development (Rutherford and Lindquist, 1998), as well as in fish stress response (Palmisano et al., 2000). In European seabass, Hsp90α is a chaperone protein for both GR1 and GR2 and plays a key role in regulating the availability of GRs for cortisol. Hsp90α activity has mostly been described during stress experiments related to exposure to warm temperatures, including in the seabass (Goikoetxea et al., 2021) and the gilthead bream *Sparus aurata* (Madeira et al., 2016). Monitoring GR1, GR2 and Hsp90α during altered gravity experiments can give us useful information on the development and the stress level of larvae hatched in microgravity or after being subjected to a hypergravity environment during embryo development.

Innate immune system: complement component protein C3 and interleukin-1β

Fish embryos and larvae have an efficient defense system to deal with aquatic pathogens, although they lack an adaptive immune system (with memory, and thus specific to the individual), which becomes functional at a later developmental stage. To recognize and efficiently destroy pathogens at an early stage of development, the innate immune system (without memory and non-specific) is activated via different pathways (Magnadóttir, 2006; Uribe et al., 2011). The key component of the innate immune system is the complement component 3 protein (C3), which plays a central role in the lytic and pro-inflammatory pathways (Yano et al., 1988; Najafpour et al., 2020). This protein was identified in the digestive system of Atlantic halibut larvae (*Hippoglossus L.*) as early as the onset of first feeding, 50 days after hatching (Hermannsdottir et al., 2009). Complement proteins have also been shown to be involved in tissue and organ regeneration. Distinct complement-triggered pathways have been shown to modulate critical responses that promote tissue reprogramming, pattern formation and regeneration across phylogenesis (Mastellos et al., 2013). Thus, monitoring C3 protein could provide information on the development of the non-specific immune system in altered conditions, assuming that environmental changes may have an impact on this.

Interleukin-1β (IL-1β) expression has been reported in several studies on vertebrates during spaceflight (Crucian et al., 2014; Buchheim et al., 2019; Krieger et al., 2021). It is an initiator of inflammation, and its expression in vertebrates can also be a response to stress (Brydon et al., 2005; Serradell et al., 2020). IL-1β has been studied in 13 teleost fish species, and it seems to function in a similar way as in other vertebrates including mammals (Uribe et al., 2011). Given that inflammation or stress can cause tissue damage affecting various organs and physiological systems of fish, in our study we quantified IL-1β transcripts to determine if simulated altered gravity impacts the expression of this innate immune gene in *D. labrax* embryo development.

Our study focused on the hatching rate and oxygen consumption of aquaculture fish eggs during a ground-based experiment simulating hypergravity using a centrifuge and simulating microgravity using a random positioning machine (RPM). The parameters studied after exposure to altered gravity were the RNA integrity number (RIN), the relative expression of glucocorticoid receptors (GR1, GR2), and Hsp90a in order to assess the stress level after conditions based on a real space mission. The C3 and IL-1β transcripts aimed to assess the early immune system status after exposure to both altered conditions just after hatching. The aim of this study was to lay the groundwork for a proof of concept of the feasibility of hatching aquaculture fish in LEO or on a future lunar base and to anticipate any countermeasures that may need to be implemented for fish welfare during such a mission.

Materials and methods

The exposure of *D. labrax* sibling embryos to simulated microgravity and hypergravity conditions was conducted at the European Space Agency (ESA) facility in Nancy, France, in separate experimental rooms, with a control group in each room. In order to evaluate the hatching rate and compare the viability of the fish, a triplicate was reared in industrial conditions that are optimal for fish production at the Ifremer aquaculture station (Palavas-les-Flots, France). The general outline of the experimental protocol is presented in Figure 1.

Experimental tanks

To conduct the experiment, a polyvinyl chloride experiment tank was built to sit inside a CubeSat (a miniaturized satellite), which is 10 cm × 10 cm x 10 cm (Figure 2A/Figure 2B). The tank diameter was 6.4 cm and it weighed 639 g when filled with water; the tank volume was 230 mL. The altered gravity experimental groups were then hermetically sealed into the CubeSats and the control groups were sealed in bottles without the possibility of renewing the water

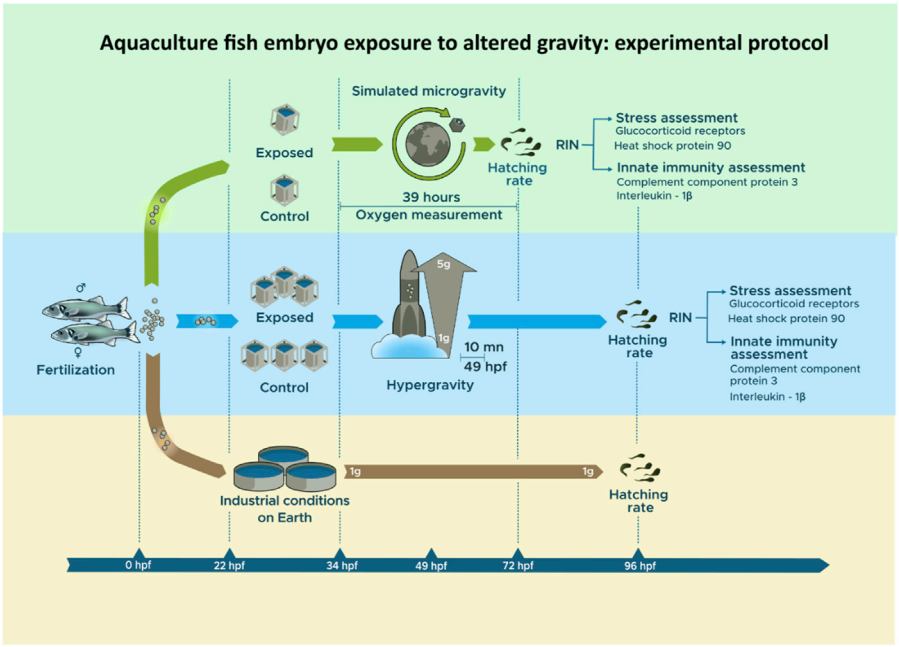


FIGURE 1
Experimental protocol from Dicentrarchus labrax fertilization to analysis post-hatching.



FIGURE 2
(A), **(B)** Experimental tank (230 mL) inside a CubeSat (n = 100 eggs) used in this experiment as well as in previous experiments to assess the impact of rocket launch vibrations on aquaculture fish hatching rate **(C)** Aquatic rotor (from 1 g to 5 g) with experimental tanks in triplicate containing European seabass embryos (n = 100 each) **(D)** Random positioning machine with a CubeSat containing European seabass embryos (n = 100) exposed for 39 h of simulated microgravity and the control CubeSat (n = 100) **(E)** PSt3 oxygen sensor and light transmitted by the optical fiber to the sensor spot for oxygen concentration measurement inside of the CubeSat window **(F)** Oxygen level concentration data transfer to the computer.

or injecting oxygen. While the experimental CubeSat can carry 200 European seabass eggs (the industrial protocol is 1 egg/mL), for this experiment on altered gravity, we decided to reduce the number of samples to 100 eggs to ensure a comfortable environment (0.43 eggs/mL), especially in terms of oxygen availability for the entire week of testing.

Aquaculture fish egg fertilization

A week before the experiment, four male and four female *Dicentrarchus labrax* were selected at the Ifremer aquaculture station (Palavas-les-Flots, France) based on sperm availability and ovulation stage. The selected fish were then isolated in a recirculating

aquaculture system (RAS) regulated at 13.2 °C. Two days before the date of the scheduled fertilization, the females were injected with gonadotropin-releasing hormone (10 µg/mL). The day of fertilization, the females were ready for egg collection. Only one male and one female with the best oocyte quality were selected for controlled fertilization in order to produce a single family for the hypergravity experiment (HGE) and the simulated microgravity experiment (SMGE) to minimize parental influence on the results. A volume of 2 mL of oocytes (n ≈ 2000) was sampled and placed into a small 150-mL beaker, assessed under the microscope and sprayed with 1 mL of fresh sperm. The fertilized eggs were then placed into an aquatic incubator at 14.5 °C, pH ≈ 8.15 and salinity ≈38%. Viable eggs were collected to be sampled.

Aquaculture fish egg sample preparation

At 20 hpf, the fish eggs (size ≈1.1 mm) were transparent, and the embryonic dome was easily visible without a clarifying agent. Due to the possible presence of dead eggs (which are a brown color), all eggs were visually selected by the same operator using a binocular microscope (Motic-w10 × 20). A total of 1,025 European seabass eggs were assessed, counted and prepared to make a pool for the hypergravity and microgravity experiments, the controls, and the control group kept in the local industrial environment. The industrial environment (Ifremer research station) is considered to provide optimal rearing conditions according to the standard RAS protocol, which has been performed successfully for more than 30 years. This control group was not subjected to the altered gravity conditions. All CubeSats and bottles were filled with filtrated (0.2 µm) water oversaturated with oxygen (240% of air saturation).

Oxygen measurement inside the CubeSat

The rate of oxygen consumption of fish embryos is difficult to measure, due to the small size of eggs and low rates of oxygen uptake. The oxygen concentration inside the CubeSat modules was regularly measured using non-invasive optical fiber technology. This method avoided opening the sealed CubeSat with the risk of degassing, preserving the fish embryos from possible stress. By placing the edge of the fiber in front of the sensor (Figure 2E), the transmitter is able to analyze the received signal and translate it into an oxygen rate (in % of air saturation) readable directly by Presens FiBox software (Figure 2F). Calibration was required before the measurement, using Milli-Q water at 0% and 100% of oxygen saturation. The temperature of the module was recorded for each measurement because this influences the calculation of oxygen concentration. All modules were filled at 22 hpf with the same marine water with constant salinity (34.8 PSU). A measurement with filtrated water (0.2 µm to avoid bacteria presence and respiration) and without eggs showed that the CubeSat lost about 15% of oxygen, probably due to a porous gasket. This loss was considered in the calculation of oxygen consumption. Oxygen measurement was performed for all groups just after the CubeSat module was hermetically sealed at 22 hpf.

Embryo oxygen consumption was calculated for the SMGE and control following the formula below:

A: [Biological oxygen loss] (μgO_2/Egg)

$$\Delta[O2]22\,\text{hpf} - 70\,\text{hpf} - (\Delta[O2] * 15\%)\text{mechanical loss} * 0.23\text{CubeSat volume} \quad (1)$$

B: [Number of hours since CubeSat sealing]

$$\Delta 22\,\text{hpf} - 70\,\text{hpf} \quad (2)$$

Oxygen consumption during the microgravity experiment (μgO_2/eggs/h) was calculated with A/B.

Transport of fish eggs from the Ifremer laboratory to the ESA's Gravitational Experimental Platform for Animal Models (GEPAM)

At 22 hpf, all groups for the altered gravity experiments were transferred to the European Space Agency GEPAM platform (Bonnefoy et al., 2021), at a distance of around 700 km, in a specific thermoregulated vehicle (16 °C). A triplicate stayed at the Ifremer laboratory and was considered as the control group in industrial conditions. The experimental groups, experimental controls and scientific team reached the gravitational experimental platform after a trip of 6 h 45.

Microgravity experiment

The simulated microgravity room was maintained at $18.1^{\pm 0.8}$ °C using air conditioning. At 34 hpf, the spherical container (6 cm in diameter) of a CubeSat filled with 230 mL of seawater (density 1.026 Kg.m_3, viscosity 1.13 mPa s) and 100 eggs (each measuring ≈1.1 mm) was attached centrally between the arms of a random positioning machine (RPM) made by Dutch Space BV (Figure 2D). An RPM is a 3D-clinostat commonly used to simulate microgravity; a study by Herranz et al. (2013) indicated that an RPM could be used with fish larval stages before they can swim freely, which was the case here. The RPM was set to rotate in "full random mode" at a random speed, direction and interval, with an angular rotation velocity between 55 and 65° per second for 39 h. The continuous random change in orientation generates effects similar to those of true microgravity in space by cancelling the terrestrial g force; this device is frequently used for ground-based experiments and is described as the best simulation of these conditions (Hemmersbach et al., 2018). During the microgravity experiment, the RPM was stopped 3 times for less than 5 min to measure oxygen levels. Oxygen measurements were carried out at 56 hpf, at the middle and at the end of microgravity exposure.

The CubeSat used as a control was prepared in an identical way to the one exposed to the RPM conditions: it contained 100 eggs at the same developmental stage and was placed in the same experimental room with controlled lighting and ventilation.

Once the eggs hatched, both the exposed and control modules (n = 100 each) were opened to count the larvae, which were sampled for biomarker analysis. Hatching rates from both CubeSats were assessed only on groups at 72 hpf.

It should be noted that random positioning machines have certain limitations compared to real exposure in space, particularly because the alteration in gravity is focused on the center of the rotation. However, in our experiment, the radius of the sphere used as the egg tank inside the CubeSat was small (3 cm) and well centered between the arms. The eggs themselves are

spherical, and their movement inside the spherical tank during RPM exposure can be likened to a kind of lottery ball machine. While we cannot accurately calculate the amount of residual gravity, we can consider that all eggs had the same likelihood of spending residence time in the center of the RPM. The 3D movement promotes mixing to the center of the CubeSat, resulting in the embryos having the same exposure to altered gravity over the 39 h of the experiment.

Hypergravity experiment

The aquatic rotor of the GEPAM facility has eight gondolas (Figure 2C), each accommodating enough space for a CubeSat tank. At 49 hpf, three CubeSats (n = 100 embryos each) were placed in non-consecutive gondolas in order to balance the device. The acceleration chosen for this test was 5g, which is slightly more than SLS-Artemis 1 and all previous Apollo missions (Table 1, and Table 2).

The experimental triplicate was exposed to 10 min in the centrifuge and the triplicate control group was placed in the same room. After exposure, all groups were put in a thermoregulated chamber ($14.8^{\pm 1.6}$ °C) until the hatching rate assessment.

Hatching rate evaluation and post-exposure sampling

Hatching in both gravity experiments occurred during the night. Counting to measure the hatching rate and biomarker sampling took place around 4 h after the peak of hatching in the simulated microgravity experiment (at 96 hpf) and in the hypergravity experiment (at 72 hpf). The difference between the two hatching periods was correlated to the ambient temperature difference inside the two experimental rooms and the temperature inside the CubeSat.

The hatching rate assessment protocol is described in Przybyla et al. (2020). Pre-larvae were sampled and fixed in order to analyze the RIN, as well as the relative expression of GR1, GR2, Hsp90a, C3 and IL-1β mRNA. Given the very early stage of development, the samples consisted of a pool of pre-larvae.

For the hypergravity experiment, one aliquot of 20 pre-larvae was sampled from each of the exposed and control CubeSats (n = 6). For the microgravity experiment, due to the fact that only one CubeSat could be attached to the RPM and that not all eggs hatched, the availability of eggs for an aliquot was more limited. As a result, three aliquots of 5, 10 and 15 pre-larvae were taken from the single CubeSat exposed to simulated microgravity and from the control CubeSat. All samples were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C for later RNA extraction. The sampling plan is described in Table 3.

The available larvae for post-hatching analysis in the single SMGE group (n = 100) were more limited than in the HGE group in triplicate (n = 300), as the sampling size was different in the two independent experiments. However, the number of individual larvae sampled and the control were symmetric.

Extraction and reverse transcription of total RNA from fish samples

Total RNA was extracted from the larvae subjected to hypergravity conditions, simulated microgravity conditions and control conditions using the Nucleospin® RNA Plus XS kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). RNA integrity analysis was performed using RNA ScreenTapes and a TapeStation 4,150 device (Agilent, Santa Clara, California, United States). From each sample, 200 ng of total RNA was reverse transcribed using random primers, dNTP, RNaseOut and MML-V reverse transcriptase (all from Invitrogen, Cergy Pontoise, France) following the manufacturer's instructions.

Quantitative PCR (qPCR)

Quantitative PCRs were performed in duplicate for a triplicate of samples (Table 3) using Takyon No ROX SYBR

TABLE 1 European seabass egg preparation for hatching rate assessment in altered gravity and the control environment.

Altered gravity experiment	Number of pools	Embryos/ pool	Experimental chamber	Chamber volume (mL)	Embryos per environment	Density (embryo/mL)
SMGE	1	100	CubeSat	230	100	0.43
SMGE Control	1	100	CubeSat	230	100	0.43
HGE	3	100	CubeSat	230	300	0.43
HGE Control	3	75	Bottle	175	225	0.43
Industrial	3	100	Basket	RAS	300	
Total	11				1,025	

TABLE 2 Launcher acceleration (in g) recorded for lunar missions (data on Apollo missions sourced from Ascent Data, NASA, https://history.nasa.gov/SP-4029/Apollo_18-20_Ascent_Data.htm).

Manned moon mission and launcher acceleration in g											
Apollo 7	Apollo 8	Apollo 9	Apollo 10	Apollo 11	Apollo 12	Apollo 13	Apollo 14	Apollo 15	Apollo 16	Apollo 17	Artemis 1
4.28	3.96	3.85	3.92	3.94	3.91	3.83	3.82	3.97	3.82	3.87	4.1

TABLE 3 Sampling plan for biomarker analysis. A single aliquot was sampled from each CubeSat exposed to hypergravity (HG1; HG2; HG3) and from each control CubeSat. For the simulated microgravity experiment, three aliquots were sampled from the single CubeSat (MG1) exposed to microgravity and from the control.

Experiment	CubeSat	Pre-larvae per sample	
		Exposed	Control
Hypergravity (6 CubeSats)	HG1	20	20
Three exposed and three control	HG2	20	20
	HG3	20	20
Simulated microgravity (2 CubeSats)	MG1.1	5	5
One exposed and one control	MG1.2	10	10
	MG1.3	15	15

MasterMix dTTP Blue (Eurogentec, Liège, Belgium) and a Mastercycler Realplex2 Real-Time PCR system (Eppendorf, Hamburg, Germany). Primers (Eurogentec, Liège, Belgium) used to amplify transcripts were designed in different exons or in junctions between exons to preclude the amplification of potential traces of genomic DNA. Primer specificity was checked using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) of the US National Center for Biotechnology Information (Bethesda, Maryland, United States). The qPCR cycling program was: 5 min at 95 °C followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 45 s at the annealing temperature indicated in Table 4. Amplification efficiency was checked with standard curves and validated in the range of 89%–100%. The stability of housekeeping transcripts was checked using BestKeeper software (Pfaffl, 2001). Relative expression of glucocorticoid receptors 1 and 2 (GR1, GR2), Hsp90α, C3 and IL-1β was normalized using two housekeeping transcripts (Fau, which encodes a ubiquitin-like protein fused to the ribosomal S30 protein, and the ribosomal protein L13) using a method previously described (Fonte et al., 2019) (Table 4).

Statistics

As the hatching rate data was expressed in percentages and close to the extreme [0; 1], statistical analysis was performed with a converted value using $y = arc \sin \sqrt{x}$. The transformed data was subjected to one-way statistical analysis of variance (ANOVA). GraphPad Prism 9.0 software (Dotmatics, Boston, Massachusetts, United States) was used to perform statistical analyses on biomarkers. Homogeneity of variance was determined using Fisher's test and the normality of distribution was determined using the Shapiro–Wilk test. When homogenous variance and distribution were observed, the parametric Student's t-test was used. When variance and distribution were not homogeneous, a logarithmic transformation was applied to the data to make it statistically in accordance with the test requirement. For the oxygen measurement, the slopes of the trend curves were compared using a linear regression method. Minimum level of significance was $p < 0.05$ and triplicate results were shown as mean value ±SD.

Ethical statement

The experiments at Ifremer and GEPAM were carried out in accordance with the recommendations of European Union Ethical

TABLE 4 Primers used to perform qPCR analyses (F: forward, R: reverse).

Target	GenBank accession number	Sequences	Length (bp)	Annealing temperature (°C)
GR1	AY549305	F: TGCACCTCGATGACCAGATG	152	62
		R: GGCAACTTCATACGTTCTTTGT		
GR2	AY619996	F: CCTGTGTGCTGGGAGGAAC	114	61
		R: GTTTTGCGTGCTTCCAGGTT		
Hsp90a	XM051407981	F: ATCATGGACAACTGCGACGA	148	61
		R: TCTTGACCAGGTTCTTGCGG		
C3	HM563078	F: TGTCAAGAACTCACGGTATCTGT	144	59
		R: CTGGGCTGTAGTTGTGGAGG		
IL-1β	AJ269472	F: GAGCTTAGTTCTGGTCCCGA	116	59
		R: CACTGGGTGTACGGTCCAAG		
Fau	FM004681	F: GACACCCAAGGTTGACAAGCAG	149	59
		R: GGCATTGAAGCACTTAGGAGTTG		
L13	DT044910	F: AACCCCTCTCGTGGACCTTA	130	60
		R: TACCGTCGAACACCTTCAGC		

Guidelines and directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. The Ifremer Marine Experimental Platform of Palavas (PEMP) permit for animal experimentation E 34-192-006 and the site's regional ethics committee (CEEA36 - Occitanie Méditerranée) guarantee the respect of handling rules by the scientific team.

Results and discussion

Embryogenesis duration and hatching rate

From egg fertilization to the end of the experiments, the water incubation temperature was kept at $14.5^{\pm1.2}$ °C in the hypergravity (HGE) conditions and $16.5^{\pm1.8}$ °C in the microgravity (SMGE) conditions. This temperature difference was due to the absence of thermoregulation in the SMGE room, and it is likely to explain why larvae were observed and counted at different times for HGE (at 96 hpf) and SMGE (at 72 hpf). Embryogenesis time is directly related to incubation temperature. Devauchelle and Coves (1988) put forward a robust model to predict European seabass egg hatching date based on incubation temperature, and this model has been regularly confirmed (Saka et al., 2001; Cucchi et al., 2012; Przybyla et al., 2020). The model accurately predicted the HGE hatching time within 1 hour. In the SMGE conditions, the European seabass eggs hatched 6 h before the expected time, which is in line with previous observations of killifish in microgravity (Scheld et al., 1976; Lychakov, 2016).

Hatching rates in other species have been previously evaluated during LEO missions: for example, with aquarium fish (n = 50) as part of the Skylab3 mission the hatching rate was 96%, and with killifish (n = 50) on the Apollo-Soyuz mission it was 22% (Hoffman et al., 1977; von Baumgarten et al., 1975). In later missions, the hatching rates recorded for medaka were 88% (n = 48) and 25% (n = 4) (Ijiri, 1998; Niihori et al., 2004). Results from our 10-min 5 g hypergravity experiment with European seabass eggs showed no significant difference compared with a control reared under optimal industrial conditions (Figure 3). The group exposed to simulated microgravity for 39 h recorded the same range of hatching performance as the industrial control group. Because we had access to only one RPM, only two hatching rates were assessed (exposed and control) for the simulated microgravity experiment, so this result should be considered to indicate a tendency rather than as robust data. For an unexplained reason, the simulated microgravity control group in the RPM room had a bad hatching percentage, which cannot be related to parental genetic inheritance because all the embryos were siblings.

Oxygen consumption in microgravity

The initial water used to fill the CubeSat containing the fish eggs was over-oxygenated to ensure a sufficient oxygen level for the entire experiment (50 h) in total confinement in the CubeSat. Despite the precautions taken, the initial saturation was slightly different between the exposed group (248.7%) and the control group (240.2%) at the beginning of the experiment. Nonetheless, oxygen concentration inside the two sealed tanks was never under 146% of air saturation, and the cause of mortality of any unhatched eggs in the experiment cannot be attributed to lack of oxygen. Oxygen concentration kinetics during confinement before exposure and during the microgravity experiment are presented in Figure 4.

The slopes of the trend curves of the exposed group and the control group were not significantly different (p = 0.8074), suggesting that the microgravity environment did not generate an additional biological demand in oxygen during embryonic development. Furthermore, a calculation of individual oxygen consumption based on the oxygen volume consumed during the experiment and the surviving fish (live embryos and hatched larvae) in the two groups revealed that the embryos in microgravity did not

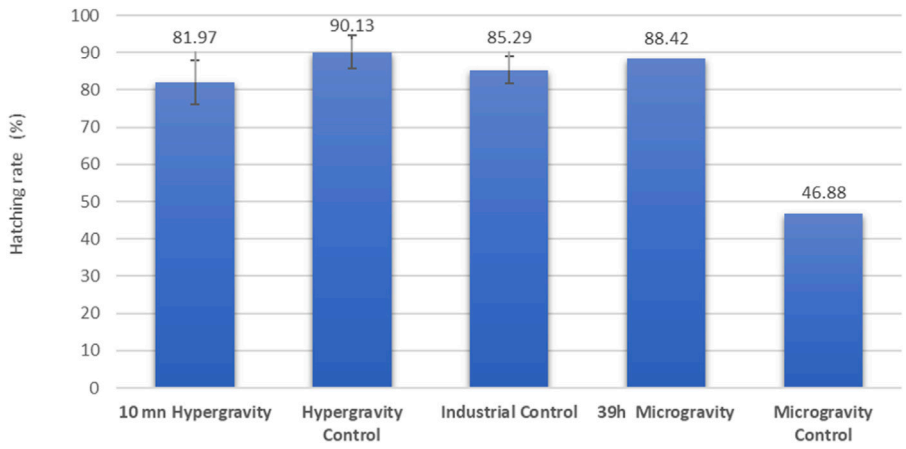


FIGURE 3
European seabass (Dicentrarchus labrax) hatching rate assessment of a family of siblings under simulated altered gravity and industrial control conditions. In the hypergravity experiment, three CubeSats were exposed for 10 min and three controls were unexposed (n = 100 fish embryos each). In the microgravity experiment, a single CubeSat (n = 100 embryos) was exposed to simulated microgravity for 39 h, and the control group (n = 100 embryos) was unexposed. The industrial control was raised in optimal ground-based aquaculture conditions. Results are expressed as mean ± SD for the hypergravity experiment (n = 3).

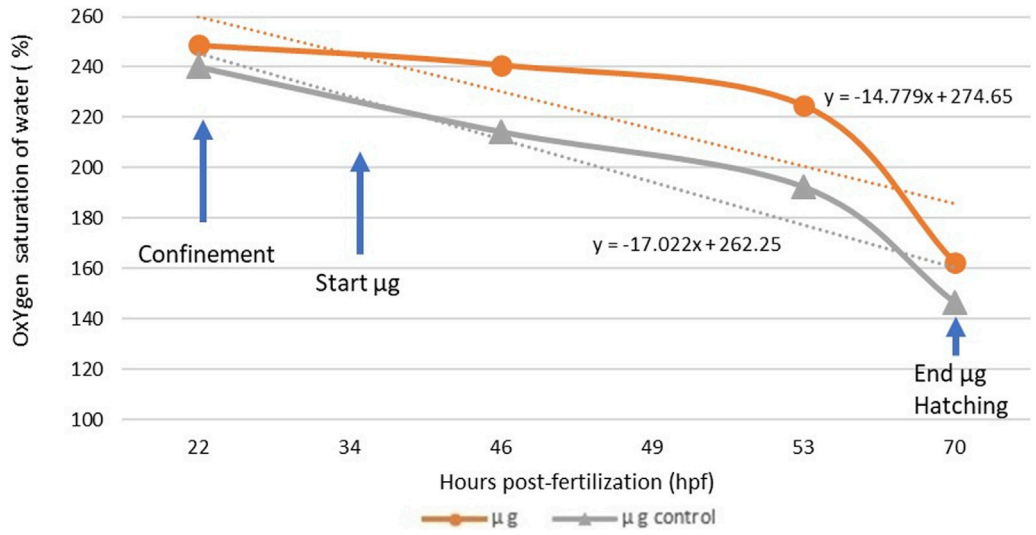


FIGURE 4
Oxygen concentration inside the CubeSat for the exposed group (n = 100 embryos) and the control group (n = 100 embryos) and trend curves during the simulated microgravity experiment. The difference between the slope of the microgravity and control group is not significant (p = 0.8074).

consume more oxygen than the control group. The number of dead eggs (thus unhatched) was higher in the control group (52.08%) than in the exposed group (11.58%). We were unable to check when exactly the mortality occurred, before or during the microgravity exposure. Oxygen consumption values in the SMGE were consistent with those observed in a previous study with *Dicentrarchus labrax* (Pionetti, 1983) and other marine species (Table 5). Statistically, individual egg oxygen consumption did not differ between exposed and control groups in simulated microgravity.

RNA integrity number

In order to assess possible degradation during altered gravity exposure, the RNA integrity number (RIN) was estimated. RNA plays a central role in reading the information encoded in the genome and transferring it into proteins. We used the RNA integrity number (RIN) as a diagnostic tool to estimate the quality of the samples, as it has been successfully used as an indicator of good RNA transcription and larvae development at hatching in other studies (Schroeder et al., 2006). RIN values range from 10 (intact) to 1 (totally degraded). Figure 5 shows that 10 min spent at a hypergravity of 5 g slightly but significantly decreased the RNA integrity number (p-value = 0.009), while 39 h of simulated microgravity did not significantly affect it.

In this study, all RIN values obtained were above 7.0, which is considered to be RNA of high quality in the zebrafish *Danio rerio* (Mazzolini et al., 2018), red seabream *Pagrus major* (Nakatsuji et al., 2019) and gilthead seabream *Sparus aurata* (Vallejos-Vidal et al., 2022). While the hypergravity experiment showed a significant influence on RNA integrity, the RIN mean value ($7.6^{\pm 0.4}$) stayed in the high-quality range and was not different from the control of the

TABLE 5 Individual oxygen consumption calculation (µg/egg/h) in the simulated microgravity experiment compared to other species according to water temperature.

Embryo species	Embryogenesis temperature (°C)	Oxygen consumption (µg/egg/h)	Author
Gadus morhua	6	0.01	Finn et al. (1995a)
Clupea harengus	8	0.05	Kiøarboe and Møhlenberg (1987)
Salmo trutta	11.5	0.70	Régnier et al. (2010)
Scophthalmus maximus	15	0.12	Finn et al. (1995b)
Dicentrarchus labrax	15	0.11	Pionetti (1983)
Dicentrarchus labrax	19	0.08	Simulated microgravity (this study)
		0.11	Simulated microgravity control (this study)
Danio rerio	25	0.37	Bang et al. (2004)
Thunnus albacares	27	0.70	Pasparakis et al. (2022)

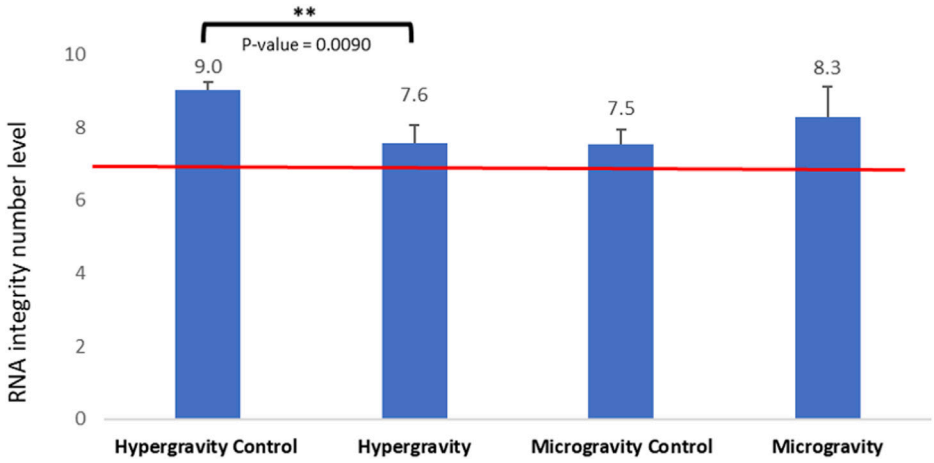


FIGURE 5
Effects of exposure to hypergravity (10 min at 5g) and simulated microgravity (39 h on the RPM) on the mean values of the RNA integrity number (RIN) of Dicentrarchus labrax embryos. The size of the replicates per condition is detailed in Table 3. Above the red line, the level of RNA integrity is considered good. Results are expressed as mean value ± SD. The statistically significant difference was found using a Student's t-test. **p < 0.01.

microgravity experiment. This observation correlates, from a physiological point of view, to the good hatching rate in the HGE group (exposed 81.97%$^{\pm 5.96}$ and control group 90.13%$^{\pm 4.36}$), suggesting that the environmental change from a hypergravity of 1g–5 g in 10 min for embryos at 49 hpf had no deleterious impact on hatched larvae of European seabass. In the microgravity experiment, the RIN mean value was not significantly different from the control, suggesting that mRNA integrity and the transcriptomic mechanism in European seabass embryos were not altered by 39 h of simulated microgravity from 34 hpf to hatching time at 96 hpf. This observation correlates to the good hatching rate in the SMGE group (88.42%).

Fish stress assessment in simulated altered gravity

Glucocorticoid receptors and chaperone protein

Previous studies on *S. aurata* juveniles (body weight 150 g) showed that GR1 expression can be significantly different 6 h post-stress (Vallejos-Vidal et al., 2022). In our experimental session, the sampling of HGE larvae was done 47 h after centrifuge exposure, so it is not surprising that glucocorticoid receptors had recovered to the control level (Figure 6). This indicates that the regulation of glucocorticoid receptor transcripts during European seabass

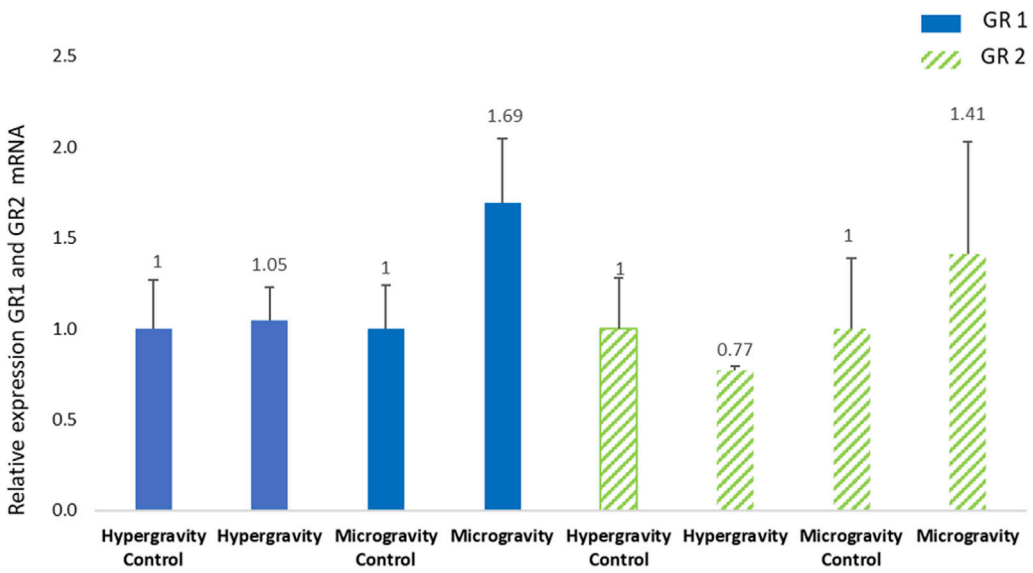


FIGURE 6
Effects of exposure of European seabass (Dicentrarchus labrax) to hypergravity (10 min at 5g) or simulated microgravity (39 h on an RPM) on glucocorticoid receptors 1 and 2 (GR1, GR2) mRNA levels. The size of the replicates per condition is detailed in Table 3. Relative values obtained with control embryos were set to 1. Results are expressed as mean ± SD.

embryogenesis was not impaired by the hypergravity simulation of a lunar launch at an early development stage.

The relative expression of GR1 and GR2 in *Dicentrarchus labrax* larvae after 39 h of exposure to simulated microgravity (sampled around 4 h after hatching) revealed no significant difference in the receptor involved in cortisol regulation. Hatching occurred at 96 hpf and the fish embryos (n = 100) spent 39 h inside a sealed CubeSat on the RPM, which represents 41% of the total embryo development. We did not observe a significant difference between the expression of GR1 and GR2 at the post-hatching stage, in contrast to a study on European seabass ontogeny without stress (Pavlidis et al., 2011) or a study in which a higher sensitivity response of GR2 than GR1 to pathogenic stress was observed at a juvenile stage (Reyes-López et al., 2018). Our results showed the same level of expression of the cortisol receptors in the exposure and control conditions, suggesting that the simulated altered gravity did not influence European seabass embryogenesis.

Hsp90α chaperone protein activity is directly related to the function of GR1 and GR2. No statistically significant difference in Hsp90α mRNA expression was observed in either experiment (Figure 7).

Madeira et al. (2016) exposed 35-day post-hatch *Sparus aurata* larvae to abiotic stress based on temperature variation and detected an increase in Hsp90α expression. In the European seabass, a downregulation of GR1 and GR2 was observed in the hypothalamus of fish submitted to relatively low rearing density (Geffroy et al., 2021). In our study, we did not observe a significant variation in GR1, GR2 and Hsp90α relative to control groups. The same level of transcription between the glucocorticoid receptors and its chaperone protein was observed, which indicates that our measurements were robust and allows us to conclude that our experimental altered gravity conditions did not affect this physiological route of stress in European seabass embryos.

Innate immune system: Proteins C3 and IL-1β

In vertebrates, innate immunity is a non-specific defense system. This mechanism is involved in identifying and fighting external aggressions. Our study investigated the function of this immune system under microgravity and extreme hypergravity conditions. The results showed variable relative C3 expression, which was highly significantly different from the 1 g control (Figure 8). Studies on C3 in gilthead seabream and European seabass juveniles (weighing around 30 g) suggest that a sampling plan $6 < n < 10$ is relevant to obtain good C3 analysis sensitivity (Mauri et al., 2011; Vaz et al., 2022). In our study, tissue samples were smaller, but the number of larvae per pool was $5 < n < 15$ for the microgravity experiment and $n = 20$ for the hypergravity experiment. We therefore assume that threshold detection is enough to validate our measurements.

In experimental conditions, Lange et al. (2004) detected the presence of C3 in cod larvae (*Gadus morhua* L.) in the yolk sac membrane and in muscle at 1-day post-hatching. Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) expressed significant C3 protein at hatching compared to the day before (embryo stage) and the day after (Lee et al., 2013). C3 expression was also monitored on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) during the embryo to larval stage. All C3 isoform expression drastically increased just after hatching (Løvoll et al., 2006; Løvoll et al., 2007). These observations are in line with our microgravity group result, but not with the hypergravity group.

The literature on C3 protein expression in European seabass hatchlings is poor, so we cannot make a confident conclusion about the significant C3 inhibition observed in the HGE group. However, this difference in C3 relative expression had no consequence on the good hatching rate recorded in the HGE group ($81.97\%^{\pm 5.96}$) and the SMGE group (88.42%). The study found that the complement protein C3 is expressed in *Dicentrarchus labrax* at the hatchling stage 4 h after leaving the chorion, suggesting that part of the innate system is functional in both altered gravity contexts.

Interleukin-1β is produced by active macrophages. It is involved in infection and inflammation, but can also play a role in the acute stress response, as has been shown in the common carp *Cyprinus carpio* (Metz et al., 2006). Its expression was observed in European

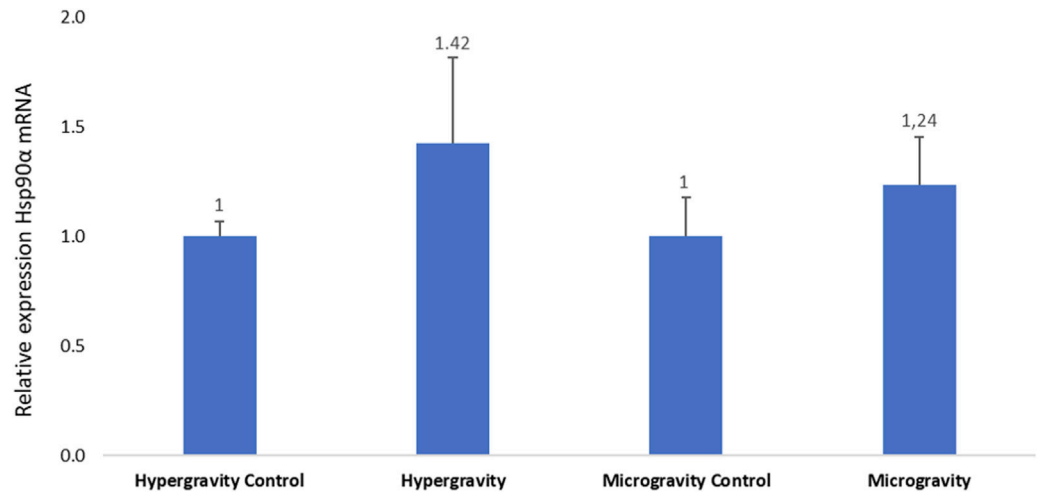


FIGURE 7
Effects of exposure to hypergravity (10 min at 5g) or simulated microgravity (39 h on an RPM) on Dicentrarchus labrax Hsp90a mRNA levels. The size of the replicates per condition is detailed in Table 3. Relative values obtained with control embryos were set to 1. Results are expressed as mean ± SD.

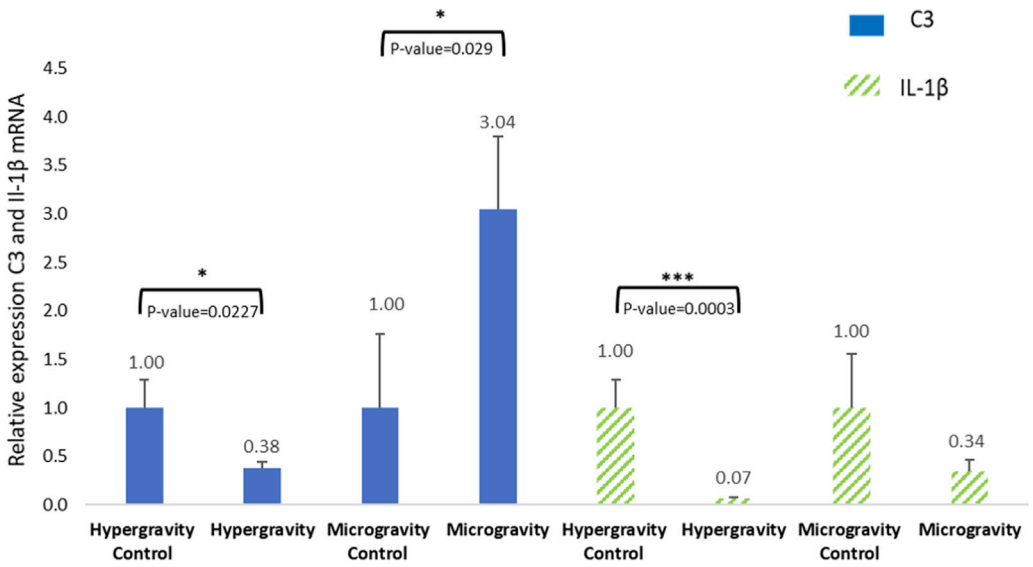


FIGURE 8
Effects of exposure to hypergravity (10 min at 5 g) or microgravity (39 h on an RPM) on C3 and IL-1β mRNA levels in Dicentrarchus labrax. The size of the replicates per condition is detailed in Table 3. Relative values obtained with control embryos were set to 1. Results are expressed as mean ± SD. Statistically significant differences were found using Student's t-tests. *$p < 0.05$, ***$p < 0.001$.

seabass 12 h following an infection by *Vibrio anguillarum* 5 days after hatching (Reyes-López et al., 2018). The overexpression of IL-1β in European seabass juveniles can appear 1.5 h–8 h after a *V. anguillarum* infection (Meloni et al., 2015). Figure 8 shows that 10 min spent at a hypergravity of 5 g significantly decreased the expression level of IL-1β mRNA. IL-1β was detected at 4 hpf, indicating the activation of the inflammatory innate immune system in both altered gravities. Yet the low level of IL-1β confirms that altered gravity does not induce inflammation or stress. The innate immune system has been studied in several fish species, but ours is the first analysis of C3 and IL-1β in just-hatched European seabass. Our findings indicate that C3 protein and IL-1β can be measured 4 hours after this species hatches. As there was a good hatching rate and given the vitality of the young larvae, the significant inhibition of complement C3 and IL-1β in the hypergravity groups cannot be linked to abnormal development or a deleterious innate immune system. The underexpression of C3 and IL-1β confirm an absence of inflammatory or physiological damage after altered gravity exposure, but may also reveal a delay in the activation of the pro-inflammatory defense mechanism. It would be valuable to study the expression of these proteins several days after hatching to verify the development of the immune system in conditions of altered gravity.

Conclusion

This prospective study indicates that the mechanism of embryogenesis in an aquaculture fish can follow normal development under simulated hyper- and microgravity conditions. Further investigation of *D. labrax*'s innate immune system at 1 g and hyper- and microgravity conditions at larval stage could confirm our hypothesis that this system is intact after altered gravity exposure. We carried out our experiments separately to allow results, analysis and conclusions in mono-parametric situations for each gravity context. A further ground-based study could involve a larger number of embryos (hence more tissue to sample) for simulated microgravity in order to consolidate our hypothesis about the absence of effect on fish stress and the innate immune system. Successive exposure to 10-min hypergravity (launch duration) and microgravity (for as long as possible) should also be tested in a future experiment to understand the cumulative effect of these conditions on aquaculture fish embryos. The shortest manned mission to reach the Moon was Apollo 8 (69 h), but the mean time this journey takes is around 72 h; this means our 39-h microgravity experiment corresponds to only half (54%) of a standard trip to the Moon. Following a previous study on European seabass and meagre (*Argyrosomus regius*) fertilized egg resistance to spacecraft-launcher vibration (Przybyla et al., 2020), this study strengthens the idea of the feasibility of shipping aquaculture fish eggs to a lunar base in order to develop space aquaculture integrated in an agricultural greenhouse or a water treatment system (Pickett et al., 2020). Cultivated aquatic organisms could provide astronauts with amino acids to complement plant sources and offer a more balanced diet. Beyond the nutritional aspect, the variety, texture and flavor of aquaculture species could help to avoid "menu fatigue" in space due to repeated consumption of the same foods and the resulting body mass loss (Douglas et al., 2020). The results of this study allow optimism and warrant envisaging a real proof of concept to validate the findings by sending aquaculture fish on a space mission in low Earth orbit or, even more valuably, on a lunar mission.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusion of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Author contributions

CP Writer and manager GRAVITY Project JB GEPAM facility management experimental hyper and micro gravity support–Biomarker paragrph author. RP Student experiment management and paragraph writer AD Student pre-experiment management and paragraph writer GD Fish egg expert and protocol management EM Fish egg expert, logistic and experimental biologist SL Broodstock manager, eggs supplier and maintenance FC Biomarkers analysis BG Fish stress expert and sampling protocol manager. JF Senior expert in gravity experiment. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

The "GRAVITY project" was funded by the French Space Agency (APR-CNES ID Action 5994 - contract 4800001083) and the French National Institute for Ocean Science (IFREMER scientific directorate R120-06-DF-01). The experiment's access to the GEPAM facility was funded by the European Space Agency through the Continuously Open Research Announcement Opportunity for Ground Based Facilities program (Contract 4000137191/21/NL/PA/pt).

Acknowledgments

The first author would like to sincerely thank Véronique Ribière for the video production detailing the stages of the study and her support for the Lunar Hatch project, and Benoit Rollin for the design and construction of the nine CubeSat modules. All co-authors are grateful to the administrative and logistics staff from the Ifremer and GEPAM laboratories involved in this project, and to the European Space Agency (ESA), the French Space Agency (CNES) and Ifremer, which made this experiment possible.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The video of the GRAVITY experiment is available on the following site: https://www.youtube.com/channel/UCRAUiMnmFkpyDmw9IIWwiWA.

References

Aceto, J., Nourizadeh-Lillabadi, R., Maree, R., Dardenne, N., Jeanray, N., Wehenkel, L., et al. (2015). Zebrafish bone and general physiology are differently affected by hormones or changes in gravity. *Plos One* 10, e0126928. doi:10.1371/journal.pone.0126928

Anken, R., Brungs, S., Grimm, D., Knie, M., and Hilbig, R. (2016). Fish inner ear otolith growth under real microgravity (spaceflight) and clinorotation. *Microgravity Sci. Technol.* 28, 351–356. doi:10.1007/s12217-015-9459-4

Anken, R. H., Ibsch, M., and Rahmann, H. (1998). Neurobiology of fish under altered gravity conditions. *Brain Res. Rev.* 28, 9–18. doi:10.1016/s0165-0173(98)00021-6

Anken, R., and Hilbig, R. (2009). Swimming behaviour of the upside-down swimming catfish (*Synodontis nigriventris*) at high-quality microgravity - a drop-tower experiment. *Adv. Space Res.* 44, 217–220. doi:10.1016/j.asr.2009.02.009

Bang, A., Gronkjaer, P., and Malte, H. (2004). Individual variation in the rate of oxygen consumption by zebrafish embryos. *J. Fish Biol.* 64, 1285–1296. doi:10.1111/j.0022-1112.2004.00391.x

Black, S., Larkin, K., Jacqmotte, N., Wassersug, R., Pronych, S., and Souza, K. (1995). "Regulative development of *Xenopus laevis* in microgravity," in *Life and gravity: Physiological and morphological responses*. Editors P. Todd, H. J. Anton, P. W. Barlow, R. Gerzer, J. M. Heim, R. HemmersbachKrause, et al. 209–217.

Bonnefoy, J., Ghislin, S., Beyrend, J., Coste, F., Calcagno, G., Lartaud, I., et al. (2021). Gravitational experimental platform for animal models, a new platform at ESA's terrestrial facilities to study the effects of micro- and hypergravity on aquatic and rodent animal models. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2961. doi:10.3390/ijms22062961

Brungs, S., Hauslage, J., Hilbig, R., Hemmersbach, R., and Anken, R. (2011). Effects of simulated weightlessness on fish otolith growth: clinostat versus rotating-wall vessel. *Adv. Space Res.* 48, 792–798. doi:10.1016/j.asr.2011.04.014

Brydon, L., Edwards, S., Jia, H., Mohamed-Ali, V., Zachary, I., Martin, J. F., et al. (2005). Psychological stress activates interleukin-1β gene expression in human mononuclear cells. *Brain Behav. Immun.* 19, 540–546. doi:10.1016/j.bbi.2004.12.003

Buchheim, J. I., Matzel, S., Rykova, M., Vassilieva, G., Ponomarev, S., Nichiporuk, I., et al. (2019). Stress related shift toward inflammaging in cosmonauts after long-duration space flight. *Front. Physiology* 10, 85. doi:10.3389/fphys.2019.00085

Cooper, M., Perchonok, M., and Douglas, G. L. (2017). Initial assessment of the nutritional quality of the space food system over three years of ambient storage. *Npj Microgravity* 3, 17. doi:10.1038/s41526-017-0022-z

Crucian, B. E., Zwart, S. R., Mehta, S., Uchakin, P., Quiriarte, H. D., Pierson, D., et al. (2014). Plasma cytokine concentrations indicate that *in vivo* hormonal regulation of immunity is altered during long-duration spaceflight. *J. Interferon Cytokine Res.* 34, 778–786. doi:10.1089/jir.2013.0129

Cucchi, P., Sucre, E., Santos, R., Leclere, J., Charmantier, G., and Castille, R. (2012). Embryonic development of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Helgol. Mar. Res.* 66, 199–209. doi:10.1007/s10152-011-0262-3

Devauchelle, N., and Coves, D. (1988). The characteristics of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) eggs: description, biochemical composition and hatching performances. *Aquat. Living Resour.* 1, 223–230. doi:10.1051/alr:1988022

Di Bella, M. L., Vazzana, M., Vizzini, A., and Parrinello, N. (2008). Glucocorticoid receptor (DlGR1) is expressed in pre-larval and larval stages of the teleost fish *Dicentrarchus labrax*. *Cell Tissue Res.* 333, 39–47. doi:10.1007/s00441-008-0605-9

Douglas, G. L., Zwart, S. R., and Smith, S. M. (2020). Space food for thought: challenges and considerations for food and nutrition on exploration missions. *J. Nutr.* 150, 2242–2244. doi:10.1093/jn/nxaa188

Edsall, S. C., and Franz-Odendaal, T. A. (2014). An assessment of the long-term effects of simulated microgravity on cranial neural crest cells in zebrafish embryos with a focus on the adult skeleton. *Plos One* 9, e89296. doi:10.1371/journal.pone.0089296

Endo, M., Kobayashi, R., Ariga, K., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2002). Postural control in tilapia under microgravity and the near infrared irradiated conditions. *Nippon. Suisan Gakkaishi* 68, 887–892. doi:10.2331/suisan.68.887

Fahrion, J., Mastroleo, F., Dussap, C.-G., and Leys, N. (2021). Use of photobioreactors in regenerative life support systems for human space exploration. *Front. Microbiol.* 12, 699525. doi:10.3389/fmicb.2021.699525

Finn, R. N., Fyhn, H. J., and Evjen, M. S. (1995a). Physiological energetics of developing embryos and yolk-sac larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*). I. Respiration and nitrogen metabolism. *Mar. Biol.* 124, 355–369. doi:10.1007/bf00363909

Finn, R. N., Widdows, J., and Fyhn, H. J. (1995b). Calorespirometry of developping embryos and yolk-sac larvae of turbot (*Scophtalmus maximus*). *Mar. Biol.* 122, 157–163. doi:10.1007/bf00349289

Fonte, C., Kaminski, S., Vanet, A., Lanfumey, L., Cohen-Salmon, C., Ghislin, S., et al. (2019). Socioenvironmental stressors encountered during spaceflight partially affect the murine TCR-β repertoire and increase its self-reactivity. *Faseb J.* 33, 896–908. doi:10.1096/fj.201800969r

Geffroy, B., Gesto, M., Clota, F., Aerts, J., Darias, M. J., Blanc, M. O., et al. (2021). Parental selection for growth and early-life low stocking density increase the female-to-male ratio in European sea bass. *Sci. Rep.* 11, 13620. doi:10.1038/s41598-021-93116-9

Goikoetxea, A., Sadoul, B., Blondeau-Bidet, E., Aerts, J., Blanc, M.-O., Parrinello, H., et al. (2021). Genetic pathways underpinning hormonal stress responses in fish exposed to short- and long-term warm ocean temperatures. *Ecol. Indic.* 120, 106937. doi:10.1016/j.ecolind.2020.106937

Hemmersbach, R., Häder, D.-P., and Braun, M. (2018). "Methods for gravitational biology research," in *Gravitational biology I: Gravity sensing and graviorientation in microorganisms and plants*. Editors M. Braun, M. Böhmer, D.-P. Häder, R. Hemmersbach, and K. Palme (Cham: Springer International Publishing), 13–26.

Hermannsdottir, R., Johannsdottir, J., Smaradottir, H., Sigurgisladottir, S., Gudmundsdottir, B. K., and Bjornsdottir, R. (2009). Analysis of effects induced by a pollock protein hydrolysate on early development, innate immunity and the bacterial community structure of first feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 595–602. doi:10.1016/j.fsi.2009.05.007

Herranz, R., Anken, R., Boonstra, J., Braun, M., Christianen, P. C., de Geest, M., et al. (2013). Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. *Astrobiology* 13, 1–17. doi:10.1089/ast.2012.0876

Hilbig, R. W., and Anken, R. H. (2017). *Impact of micro- and hypergravity on neurovestibular issues of fish*. Sensory Motor and Behavioral Research in Space, 59–86.

Hoffman, R. B., Salinas, G. A., and Baky, A. A. (1977). Behavioral analyses of killifish exposed to weightlessness in the Apollo-Soyuz test project. *Space Environ. Med.* 48, 712–717.

Ijiri, K. (1998). Development of space-fertilized eggs and formation of primordial germ cells in the embryos of Medaka fish. *Adv. Space Res.* 21, 1155–1158. doi:10.1016/s0273-1177(97)00205-6

Irons, L. G., and Irons, M. A. (2023). Pancosmorio (world limit) theory of the sustainability of human migration and settlement in space. *Front. Astronomy Space Sci.* 10. doi:10.3389/fspas.2023.1081340

Kiøarboe, T., and Møhlenberg, F. (1987). Partitioning of oxygen consumption between "maintenance" and "growth" in developing herring Clupea harengus (L.) embryos. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 111, 99–108. doi:10.1016/0022-0981(87)90048-7

Krieger, S. S., Zwart, S. R., Mehta, S., Wu, H. L., Simpson, R. J., Smith, S. M., et al. (2021). Alterations in saliva and plasma cytokine concentrations during long-duration spaceflight. *Front. Immunol.* 12, 725748. doi:10.3389/fimmu.2021.725748

Lange, S., Bambir, S., Dodds, A. W., and Magnadóttir, B. (2004). The ontogeny of complement component C3 in atlantic cod (*Gadus morhua* L.)—An immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 359–367. doi:10.1016/j.fsi.2003.06.001

Lee, J. W., Lee, Y. M., Lee, J. H., Noh, J. K., Kim, H. C., Park, C. J., et al. (2013). The expression analysis of complement component C3 during early developmental stages in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Dev. Reprod.* 17, 311–319. doi:10.12717/dr.2013.17.4.311

Løvoll, M., Johnsen, H., Boshra, H., Bogwald, J., Sunyer, J. O., and Dalmo, R. A. (2007). The ontogeny and extrahepatic expression of complement factor C3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.* 23, 542–552. doi:10.1016/j.fsi.2007.01.002

Løvoll, M., Kilvik, T., Boshra, H., Bogwald, J., Sunyer, J. O., and Dalmo, R. A. (2006). Maternal transfer of complement components C3-1, C3-3, C3-4, C4, C5, C7, Bf, and Df to offspring in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics* 58, 168–179. doi:10.1007/s00251-006-0096-3

Lychakov, D. V. (2016). Behavioural and functional vestibular disorders after space flight: 2. Fish, amphibians and birds. *J. Evol. Biochem. Physiology* 52, 1–16. doi:10.1134/s0022093016010014

Madeira, D., Araujo, J. E., Vitorino, R., Capelo, J. L., Vinagre, C., and Diniz, M. S. (2016). Ocean warming alters cellular metabolism and induces mortality in fish early life stages: A proteomic approach. *Environ. Res.* 148, 164–176. doi:10.1016/j.envres.2016.03.030

Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 137–151. doi:10.1016/j.fsi.2004.09.006

Mastellos, D. C., DeAngelis, R. A., and Lambris, J. D. (2013). Complement-triggered pathways orchestrate regenerative responses throughout phylogenesis. *Seminars Immunol.* 25, 29–38. doi:10.1016/j.smim.2013.04.002

Mauri, I., Roher, N., MacKenzie, S., Romero, A., Manchado, M., Balasch, J. C., et al. (2011). Molecular cloning and characterization of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and Gilthead seabream (*Sparus aurata*) complement component C3. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 1310–1322. doi:10.1016/j.fsi.2011.03.013

Mazzolini, J., Chia, K., and Sieger, D. (2018). Isolation and RNA extraction of neurons, macrophages and microglia from larval zebrafish brains. *Jove-Journal Vis. Exp.*, 57431. doi:10.3791/57431

Meloni, M., Candusso, S., Galeotti, M., and Volpatti, D. (2015). Preliminary study on expression of antimicrobial peptides in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) following *in vivo* infection with Vibrio anguillarum. A time course experiment. *Fish Shellfish Immunol.* 43, 82–90. doi:10.1016/j.fsi.2014.12.016

Metz, J. R., Huising, M. O., Leon, K., Verburg-van Kemenade, B. M. L., and Flik, G. (2006). Central and peripheral interleukin-1β and interleukin-1 receptor I expression and their role in the acute stress response of common carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Endocrinol.* 191, 25–35. doi:10.1677/joe.1.06640

Nakatsuji, N., Adachi, K., and Morioka, K. (2019). Long-term stability of RNA isolated from muscle of red seabream (*Pagrus major*) during ice storage. *Fish Physiology Biochem.* 45, 819–828. doi:10.1007/s10695-018-0588-8

Najafpour, B., Cardoso, J. C. R., Canario, A. V. M., and Power, D. M. (2020). Specific evolution and gene family expansion of complement 3 and regulatory factor H in fish. *Front. Immunol.* 11, 568631. doi:10.3389/fimmu.2020.568631

Niihori, M., Mogami, Y., Naruse, K., and Baba, S. A. (2004). Development and swimming behavior of medaka fry in a spaceflight aboard the space shuttle Columbia (STS-107). *Zoological Sci.* 21, 923–931. doi:10.2108/zsj.21.923

Palmisano, A. N., Winton, J. R., and Dickhoff, W. W. (2000). Tissue-specific induction of Hsp90 mRNA and plasma cortisol response in chinook salmon following heat shock, seawater challenge, and handling challenge. *Mar. Biotechnol.* 2, 329–338. doi:10.1007/s101260000005

Pasparakis, C., Wang, Y., Heuer, R. M., Zhang, W., Stieglitz, J. D., McGuigan, C. J., et al. (2022). Ultraviolet avoidance by embryonic buoyancy control in three species of marine fish. *Sci. Total Environ.* 806, 150542. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.150542

Pavlidis, M., Karantzali, E., Fanouraki, E., Barsakis, C., Kollias, S., and Papandroulakis, N. (2011). Onset of the primary stress in European sea bass Dicentrarhus labrax, as indicated by whole body cortisol in relation to glucocorticoid receptor during early development. *Aquaculture* 315, 125–130. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.09.013

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45–e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45

Pickett, M. T., Roberson, L. B., Calabria, J. L., Bullard, T. J., Turner, G., and Yeh, D. H. (2020). Regenerative water purification for space applications: needs, challenges, and technologies towards 'closing the loop. *Life Sci. Space Res.* 24, 64–82. doi:10.1016/j.lssr.2019.10.002

Pionetti, J.-M. (1983). The oxygen consumptionof sea bass *Dicentrarchus labrax* in relation to development. *Oceanis* 9, 5.

Poulet, L., Engeling, K., Hatch, T., Stahl-Rommel, S., Velez Justiniano, Y.-A., Castro-Wallace, S., et al. (2022). Large-scale crop production for the Moon and Mars: current gaps and future perspectives. *Front. Astronomy Space Sci.* 8. doi:10.3389/fspas.2021.733944

Przybyla, C., Dutto, G., Bernard, M., Rollin, B., Laurand, X., Averseng, J., et al. (2020). European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and meagre (Argyrosomus regius) fertilized egg resistance to a spacecraft launcher vibration qualifying test. *Aquac. Int.* 28, 2465–2479. doi:10.1007/s10499-020-00601-5

Przybyla, C. (2021). Space aquaculture: prospects for raising aquatic vertebrates in a bioregenerative life-support system on a lunar base. *Front. Astronomy Space Sci.* 8. doi:10.3389/fspas.2021.699097

Régnier, T., Bolliet, V., Labonne, J., and Gaudin, P. (2010). Assessing maternal effects on metabolic rate dynamics along early development in brown trout (*Salmo trutta*): an individual-based approach. *J. Comp. Physiology B* 180, 25–31. doi:10.1007/s00360-009-0385-x

Reyes-López, F. E., Aerts, J., Vallejos-Vidal, E., Ampe, B., Dierckens, K., Tort, L., et al. (2018). Modulation of innate immune-related genes and glucocorticoid synthesis in gnotobiotic full-sibling European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae challenged with Vibrio anguillarum. *Front. Immunol.* 9, 914. doi:10.3389/fimmu.2018.00914

Rutherford, S. L., and Lindquist, S. (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396, 336–342. doi:10.1038/24550

Sadoul, B., and Geffroy, B. (2019). Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. *J. Fish Biol.* 94, 540–555. doi:10.1111/jfb.13904

Saka, Ş., Fırat, M. K., and Kamaci, H. O. (2001). The development of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) eggs in relation to temperature. *Turkish J. Veterinary Animal Sci.* 25, 139–147.

Salazar Moscoso, M., Joly Ruiz Castellanos, S., Anglada Escudé, G., and Ribas Cabezas, L. (2022). *Hypergravity induces changes in physiology, gene expression and*

epigenetics in zebrafish, 4th Symposium on Space Educational Activities. Universitat Politècnica de Catalunya.

Scheld, H. W., Boyd, J. F., Bozarth, G. A., Conner, J., Eichler, V. B., Fuller, P. M., et al. (1976). *Killifish hatching and orientation experiment MA-161*.

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., et al. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* 7, 3. doi:10.1186/1471-2199-7-3

Serradell, A., Torrecillas, S., Makol, A., Valdenegro, V., Fernández-Montero, A., Acosta, F., et al. (2020). Prebiotics and phytogenics functional additives in low fish meal and fish oil based diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effects on stress and immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* 100, 219–229. doi:10.1016/j.fsi.2020.03.016

Tacon, A. G. J., Lemos, D., and Metian, M. (2020). Fish for health: improved nutritional Quality of cultured fish for human consumption. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 28, 449–458. doi:10.1080/23308249.2020.1762163

Trout, O. F., Jr., and Bruchey, W. J., Jr. (1969). Water immersion reduced-gravity simulation. *Hum. Factors* 11, 473–487. doi:10.1177/001872086901100507

Tsalafouta, A., Papandroulakis, N., Gorissen, M., Katharios, P., Flik, G., and Pavlidis, M. (2014). Ontogenesis of the HPI axis and molecular regulation of the cortisol stress response during early development in *Dicentrarchus labrax*. *Sci. Rep.* 4, 5525. doi:10.1038/srep05525

Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., and Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Med.* 56, 486–503. doi:10.17221/3294-vetmed

Vallejos-Vidal, E., Sanz-Milián, B., Teles, M., Reyes-Cerpa, S., Mancera, J. M., Tort, L., et al. (2022). The gene expression profile of the glucocorticoid receptor 1 (gr1) but not gr2 is modulated in mucosal tissues of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to acute air-exposure stress. *Front. Mar. Sci.* 9. doi:10.3389/fmars.2022.977719

Vaz, M., Pires, D., Pires, P., Simões, M., Pombo, A., Santos, P., et al. (2022). Early immune modulation in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles in response to betanodavirus infection. *Fishes* 7, 63. doi:10.3390/fishes7020063

von Baumgarten, R. J., Simmonds, R. C., Boyd, J. F., and Garriott, O. K. (1975). Effects of prolonged weightlessness on the swimming pattern of fish aboard Skylab 3. *Aviat. Space Environ. Med.* 46, 902–906.

Wiederhold, M. L., Harrison, J. L., and Gao, W. Y. (2003). A critical period for gravitational effects on otolith formation. *J. Vestib. Research-Equilibrium Orientat.* 13, 205–214. doi:10.3233/ves-2003-134-605

Yano, T., Hatayama, Y., Matsuyama, H., and Nakao, M. (1988). Titration of the alternative complement pathway activity of representative cultured fishes. *Nippon. Suisan Gakkaishi* 54, 1049–1054. doi:10.2331/suisan.54.1049