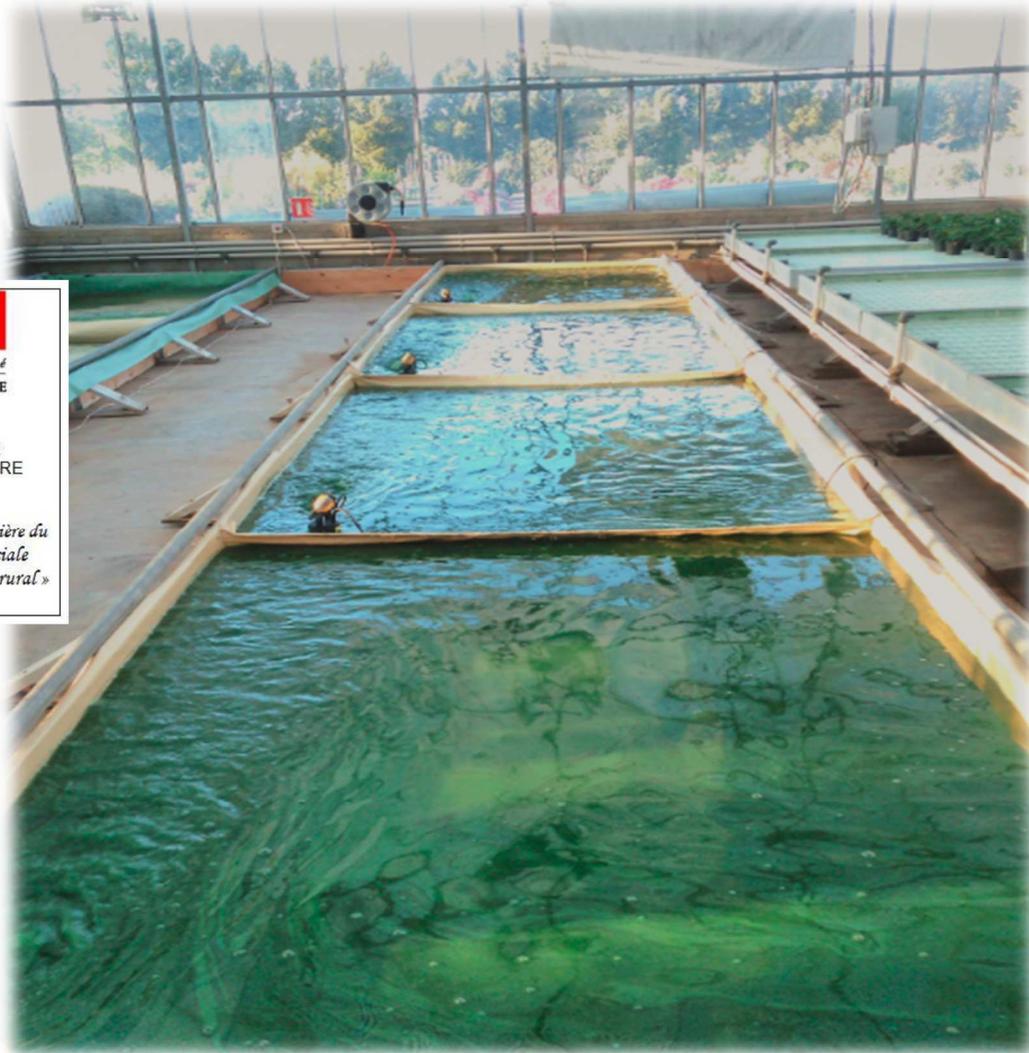




Projet « Spiruline Paysanne »

(CAS DAR 5504) (2015/2019)



Compilation de Rapports d'essais :

1/ CEVA (actions 2 et 4) : « Les Souches » ; « Transformation et qualité ».

2/ ITAVI (actions 1, 3 et 5) : Intrants, performances et qualité ; possibilités d'intrants « biologiques ».

3/ Lycée de la Canourgue (action 1,4 et 5) : Intrants biologiques, performances et qualité.

CENTRE D'ÉTUDE
& DE VALORISATION
DES ALGUES

ALGAE TECHNOLOGY
& INNOVATION
CENTRE

Spiruline paysanne

Axe 2 : Souches

Axe 4 : Transformation, qualité et valorisation
de la spiruline produite

Août 2019



CEVA



Table des matières

Contexte	3
AXE 2 : Souches	5
1. Année 1 : Caractérisation, isolement et mise en collection des souches.....	5
1.1. Prélèvement et expédition des souches.....	5
1.2. Caractérisation et isolement des souches.....	5
1.3. Protocole d'isolement et de purification des souches.....	8
2. Année 2 : Etude des performances des souches.....	13
3. Année 3 : Maintien de la collection, fourniture de souches et travaux sur les droites	15
3.1. Maintien et optimisation de la collection	15
3.2. Fourniture de souches.....	16
3.3. Travaux sur les droites	17
AXE 4 : Transformation, qualité et valorisation de la spiruline produite.....	17
1. Spiruline et vitamine B12	18
1.1. Contexte.....	18
1.2. Présentation de la vitamine B12.....	18
1.3. Méthodes d'analyse.....	20
1.4. La vitamine B12 dans les algues	21
1.5. Spiruline et vitamine B12.....	23
1.6. Références bibliographiques.....	24
1.7. Page de communication vitamine B12 sur le site de la FSF.....	26
2. Installations de séchage.....	27

Table des figures

Figure 1 : structure générale du projet.....	4
Figure 2 : Processus de caractérisation et de mise en collection.....	5
Figure 3 : Illustration de la méthode d'isolement des filaments	9
Figure 4 : Système de filtration sous vide	12
Figure 5 : Dispositif expérimental des essais Performances	13
Figure 6 : Photographie au microscope de la souche E13VR à 15°C (gauche) et 30°C (droite)	14
Figure 7 : Photographie des boîtes de Pétriensemencées à J30	15
Figure 8 : Photographie au microscope de la souche XP83RR à J30 sur milieu gélosé.....	16
Figure 9 : Photographie au microscope de la souche XP83RR à J30 sur milieu gélosé.....	16
Figure 10 : structure de la cobalamine (Nielsen & al, 2012, Chamlagain & al, 2015)	19
Figure 11 : Résultats d'analyse en vitamine B12 des algues bretonnes (Sensalg, CEVA 2016).....	22



Table des tableaux

Tableau 1 : Liste des échantillons réceptionnés et des morphologies observées	6
Tableau 2 : Liste des souches en collection au CEVA à l'issue du projet Spiruline paysanne	7
Tableau 3 : Synthèse des résultats de performances des souches sur la base des absorbances maximales	14
Tableau 4 : Synthèse des résultats de conservation sur milieu gélosé	15
Tableau 5 : Synthèse des souches fournies aux partenaires et adhérents FSF	17
Tableau 6 : teneur en vitamine B12 dans les aliments (Souci & al, 1994)	21



<i>Acronyme projet</i>	Spiruline paysanne (AMP 15003)
<i>Commanditaire/Contact</i>	Projet CAS DAR/ITAVI (FSF)
<i>Date de début de projet</i>	1/10/2015
<i>Objet</i>	La production de spiruline « paysanne » en France : caractérisation des procédés, qualité des produits, reconnaissance et formation.
<i>Devis CEVA</i>	Proposition Casdar 2015
<i>Chefs de projet CEVA</i>	Axe 2 : Amance CORAT, Service Aquaculture et Sourcing (AQUAS) Axe 4 : Hélène Marfaing, service Innovation et produits (InPro)

Contexte

Les producteurs français de spiruline paysanne ont axé leur démarche de développement sur la durabilité des entreprises et la qualité des produits. La toute nouvelle « filière spiruline » se positionne pour une alimentation saine et des producteurs vivant décemment de leur métier.

Le projet Spiruline Paysanne vise une meilleure caractérisation des systèmes de production et une connaissance optimale du produit jusqu'à sa valorisation, afin de permettre le développement de démarches-qualité, de consolider l'accompagnement technique de la filière et la formation des producteurs.

Les objectifs poursuivis, au travers de suivis / analyses sur plusieurs fermes de références sont de :

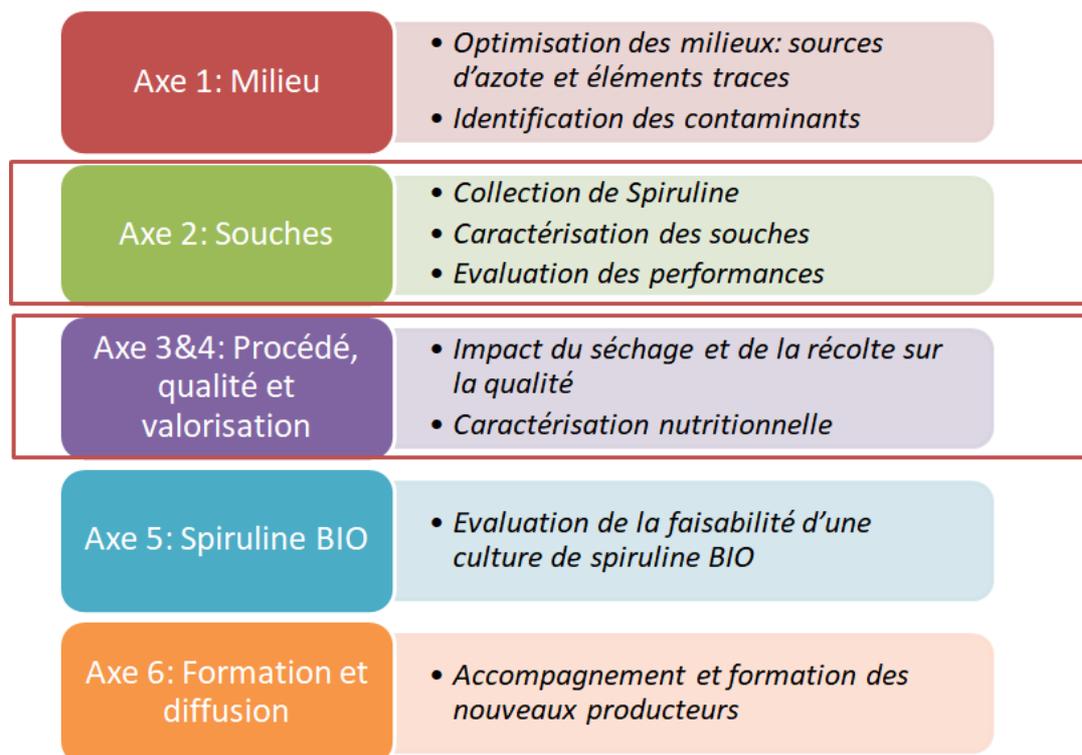
- Mieux connaître la biologie et l'écologie de l'espèce en conditions de culture ;



- Préserver les souches actuellement cultivées : identifier, conserver et distribuer aux producteurs des variétés reconnues pour leur qualité et productivité ;
- Définir, encadrer et guider les pratiques de production, notamment par l'élaboration d'un référentiel de production artisanale Française, et aider à la finalisation du Guide des Bonnes Pratiques d'Hygiène (GBPH) ;
- Donner les éléments afin d'envisager la création d'un cahier des charges de production « spiruline biologique », en tenant compte des atouts et contraintes d'une labellisation ;
- Valoriser la production française de spiruline et proposer un produit de qualité gustative, nutritionnelle et - sanitaire conforme aux attentes des consommateurs tout en préservant les ressources et la qualité de l'environnement: amélioration continue et sensibilisation des acteurs ;
- Accompagner le transfert du savoir-faire technico-économique : guide technique, données économiques, formation professionnalisante et diplômante dans la démarche « Produisons Autrement » portée par le Ministère de l'Agriculture.

Les objectifs du projet ont été déclinés en 6 axes :

Figure 1 : structure générale du projet



La contribution du CEVA a porté sur les axes 2 et 4 (encadrés en rouge) du projet Spiruline paysanne.



AXE 2 : Souches

La contribution à l'axe 2 : souches, a porté sur les sujets suivants :

- ✓ La caractérisation, l'isolement et la mise en collection des souches de la FSF
- ✓ L'étude des performances de 5 souches sélectionnées au sein de la collection
- ✓ Le maintien et l'optimisation de la collection
- ✓ La fourniture de souches aux partenaires du projet et adhérents FSF

1. Année 1 : Caractérisation, isolement et mise en collection des souches

1.1. Prélèvement et expédition des souches

Un protocole de prélèvement et d'expédition a été transmis à une sélection de fermes adhérentes à la FSF. Celles-ci ont expédiées à partir du 06/06/2016 jusqu'au 26/06/2016 un total de 15 échantillons de culture de spiruline (« Echantillon brut »).

Figure 2 : Processus de caractérisation et de mise en collection



1.2. Caractérisation et isolement des souches



Ces échantillons ont été codés puis caractérisés au CEVA à réception sur la base des critères suivants :

- Longueur des filaments
- Largeur des filaments
- Nombre de spires
- Espacement des spires

Le code appliqué « Code souche » est défini sur la nomenclature suivante :

- Initiale du nom de la souche (LO pour Lonar – P pour Paracas – C pour camarguaise, ...)
- N° du département de provenance
- Initiale de l'expéditeur (RB pour Rémy BOSC, GP pour Gilles PLANCHON)

Après caractérisation, l'ensemble des cultures brutes de spiruline ont été isolées selon le protocole fourni en 1.3. Pour chaque échantillon brut, plusieurs morphologies ont pu être isolées (ondulés : Paracas ; spiralés : Lonar ; droites). Trois conditions de mise en culture ont été testées initialement :

- La mise en culture sur milieu de laboratoire « Spirulina medium »
- La mise en culture sur milieu FSF stérile
- La mise en culture sur milieu FSF « propre » avec conservation de la flore d'accompagnement (filtrat des échantillons bruts)

Seule la condition sur Spirulina medium a permis une reprise de croissance des filaments isolés. C'est donc cette condition **uniquement** qui a été conservée pour la mise en collection des souches.

Au total sur les 15 échantillons réceptionnés, 25 souches ont été isolées et mises en collection. Le détail est fourni dans le tableau 1.

Tableau 1 : Liste des échantillons réceptionnés et des morphologies observées

<i>Nom souche</i>	<i>Dénomination</i>	<i>Nb de morphologies observées</i>
Camarguaise	C34GP	1
Paracas	P34GP	1
Ramgar	R34GP	1
Tchadienne	T66CL	2
Ethiopienne	E83RR	1
Malgache	M83RR	3
Kenyane	K83RR	1
XXL Paracas	X83RR	1
Paracas	P34RB	1
Lonar	LO38RG	2
Andalouse	A35FP	1
Paracas	P81AC	1
Ethiopienne/XXL	E13VR/X13VR	2



Laayoune/Paracas	LA34VB/P34VB	3
Lonar/Paracas	LO83GY/P83GY	4
Total		25

Sur les 25 morphologies isolées, seulement 20 d'entre elles ont été sélectionnées et maintenue en collection. Sur la durée du projet, d'autres souches ont ensuite été intégrées progressivement à la collection. Le contenu à la fin du projet de la collection est donné dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : Liste des souches en collection au CEVA à l'issue du projet Spiruline paysanne

N°	Code souche	Caractéristique	Date de mise en collection
1	C34GP	Paracas	21/09/2016
2	P34GP	Paracas	21/09/2016
3	R34GP	Lonar	21/09/2016
4	T66CL	Lonar	21/09/2016
5	E83RR	Lonar	21/09/2016
6	M83RR	Lonar	21/09/2016
7	MD83RR	Droite	21/09/2016
8	K83RR	Lonar	21/09/2016
9	XP83RR	Paracas	21/09/2016
10	P34RB	Paracas	21/09/2016
11	LO38RG	Lonar	21/09/2016
12	D38RG	Droite	21/09/2016
13	LA34BV	Lonar	21/09/2016
14	P34BV	Paracas	21/09/2016
15	A35FP	Lonar	21/09/2016
16	E13VR	Paracas	21/09/2016
17	LO83GY	Lonar	21/09/2016



N°	Code souche	Caractéristique	Date de mise en collection
18	P83GY	Paracas	21/09/2016
19	D83GY	Droite	21/09/2016
20	P81AC	Paracas	21/09/2016
21	P85FR	Paracas	01/08/2017
22	L85FR	Lonar	01/08/2017
23	D85FR	Droite	01/08/2017
24	LPMEB	Lonar (EDM)	28/11/2016
25	PAMEB	Intermédiaire	28/11/2016
26	LCRMEB	Lonar	28/11/2016
27	LA85FR	Laayoune	20/03/2018
28	P69PF	Paracas	26/07/2018
29	LO69PF	Lonar	26/07/2018
30	D69PF	Droite (petite)	26/07/2018
31	DL69PF	Droite (longue)	26/07/2018

Une fois les souches isolées et mise en collection, une seconde caractérisation morphologique des souches isolées a été réalisée (Figure 2).

L'ensemble des données de caractérisation ont donné lieu à la création d'une base de données sous format Excel pour chacune des souches isolées (disponible sur le Drive du projet).

Des différences significatives ont été observées sur les critères de caractérisation entre les échantillons brutes et isolés et principalement sur le critère espacement des spires. Il semblerait donc que les conditions de culture (milieu, température, ...) influencent la morphologie des filaments de spiruline. De la même manière, une diversité importante est observé pour des souches de la même origine (exemple : Paracas, Laayoune,...). En effet, en fonction des zones de prélèvement mais également de l'historique des souches des dérives morphologiques sont constatées.

Les souches en collection sont entretenues en tube à essai (2-3 ml), sur milieu liquide spirulina medium, en enceinte thermostatée à 20°C, faible intensité lumineuse 15-30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ avec une fréquence de repiquage de 2 mois.

1.3. Protocole d'isolement et de purification des souches

- ✓ Objectif



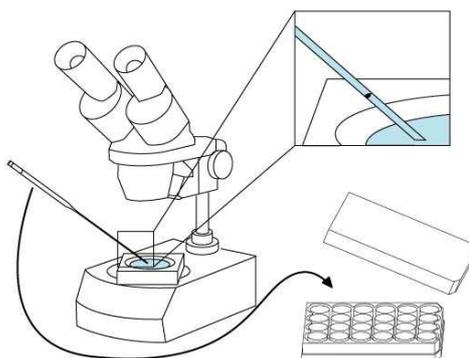
L'isolement et la purification des souches ont pour but de disposer d'une part des souches « pures » pour la mise en collection (souchothèque) et d'autre part des souches « propres » isolées des contaminants néfastes à la culture mais accompagnées par la flore bactérienne. L'objectif à terme est d'évaluer la faisabilité d'une banque de souches « pures » et « propres » et de comparer les performances des souches isolées selon ces deux méthodes d'isolement pour mettre en évidence l'impact de la flore accompagnatrice sur la croissance par exemple.

✓ Principe général de l'isolement

C'est l'étape suivant la caractérisation du prélèvement.

Il s'agit de prélever un unique filament de spiruline au microscope à l'aide d'une micropipette. Pour cela, un échantillon de spiruline est prélevé puis dilué afin de faciliter le prélèvement d'un filament. Sous le microscope, il s'agit ensuite avec la pointe de la micropipette de sélectionner un filament unique et de le prélever. Une fois le filament prélevé, celui-ci est transféré dans un récipient contenant du milieu de culture.

Figure 3 : Illustration de la méthode d'isolement des filaments



✓ Isolement souche « pures » ou « axéniques »

a) Equipements

- Hotte à flux lumineaire
- Autoclave
- Microscope binoculaire
- Enceinte de culture thermostatée

b) Matériel

- Milieu stérile
- Tubes à essai clos avec du coton cardé autoclavés 20 minutes à 121°C
- Ballon de solution 1 de Spirulina medium Andersen autoclavé 20 minutes à 121°C
- Ballon de solution 2 de Spirulina medium Andersen autoclavé 20 minutes à 121°C



- Solution de vitamine B12 à 5mg/L
- Ballon vide d'un volume permettant de contenir les solutions 1 et 2
- Portoir à tubes
- Pointes de micropipette stériles
- Micropipette
- Boîtes de pétri stérile
- Seringue + filtre-seringue stérile (PES 0.22µm)

c) Préparation

Après autoclavage, lorsque les ballons de solution 1 et 2 sont refroidis. Sous la hotte, mélanger les solutions 1 et 2 dans le ballon vide.

Mettre quelques mL de la solution de vitamine dans un couvercle de boîte de Pétri. Filtrer la solution avec un filtre-seringue stérile (0.22µm), et déposer la solution filtrée dans un nouveau couvercle de boîte de Pétri.

A l'aide d'une micropipette, ajouter les vitamines filtrées au ballon de Spirulina Medium (1+2), à raison de 1mL/L de milieu.

d) Méthode d'isolement

- Etiqueter les tubes avec le code Souche correspondant à la souche isolée
- Prélever 2 ml de chaque souche dans un Eppendorf étiqueté avec le code Souche
- Sous la hotte, préparer 4 couvercles de boîte de Pétri (A, B, C et D) dans lesquels seront ajoutés 500µL de Spirulina Medium autoclavé (avec vitamines).
- Dans la boîte de Pétri A, diluer 50µL de l'échantillon de culture.
- Placer la boîte de Pétri ouverte sous le microscope : binoculaire ou au grossissement X10
- Observer et identifier un filament à prélever
- A l'aide d'une micropipette ou d'une pipette Pasteur stérile, prélever le filament et le déposer dans la boîte de Pétri B. Répéter l'opération jusqu'à avoir 3 filaments de la morphologie souhaitée. Changer de pointes ou de pipette stérile à chaque prélèvement.
- A l'aide d'une micropipette ou d'une pipette Pasteur stérile, reprélever individuellement les filaments et les déposer dans la boîte de Pétri C. Changer de pointes ou de pipette stérile à chaque prélèvement.
- Dans la boîte D, déposer 3 gouttes de milieu de culture stérile avec une pointe ou une pipette stérile.
- Prélever chacun des filaments isolés et les déposer dans une goutte de la boîte D, de manière à avoir un filament par goutte.
- Observer l'échantillon sur la lame afin de s'assurer que chaque filament est bien contenu dans sa goutte.
- Après vérification, prélever à nouveau chaque filament et sous la hotte à flux laminaire, placer les chacun dans un tube à essai distinct préalablement rempli avec du milieu stérile.
- S'assurer que chaque filament a bien été transféré dans le tube par pipetage successif.
- Reboucher les tubes à essai avec leur coton cardé
- Placer les tubes dans l'enceinte climatique à 25°C à faible intensité lumineuse.
- Augmenter progressivement l'intensité lumineuse.

e) Repiquage et entretien



L'isolement pourra être réalisé à nouveau si besoin à partir de la 1^{ère} génération isolée selon le même protocole. De la même manière, les isolements devront être dilués à fréquence régulière (tous les 2 mois maximum) afin d'assurer leur maintien.

L'ensemble des manipulations sera réalisé sous la hotte à flux laminaire. Les dilutions seront réalisées à partir de milieu et de matériel autoclavés stériles.

f) Contrôle des isolements

Dans un premier temps, les isolements seront contrôlés de manière visuelle uniquement : verdissement ou non de l'isolement.

Une observation du tube à essai à la loupe binoculaire pourra être réalisée afin de visualiser les filaments présents.

Dès que l'échantillon montre un verdissement, il s'agira de prélever une goutte de l'isolement sous hotte à l'aide d'une micropipette munie d'un cône stérile puis de placer la goutte sur une lame de microscope propre pour observation. Sur le prélèvement réalisé, le protocole de caractérisation sera appliqué.

Le contrôle des isolements sera réalisé toutes les deux semaines au début puis tous les mois.

✓ Isolement souches « propres » = « non stériles » (Non conservé)

a) Equipements

- Paillasse propre
- Microscope binoculaire
- Enceinte de culture thermostatée
- Système de filtration et membrane (3.0 µm)

b) Matériel

- Milieu de culture
- Javel 2.6%
- Thiosulfate de sodium
- Tube à essai
- Portoir à tube
- Pipette à usage unique
- Eau déminéralisée
- Alcool à 70°

c) Préparation matériel et milieu

- Javelliser le milieu avec de la javel à 0.1% soit pour 1L de milieu 38.5 ml de javel à 2.6% (ou 10.4 mL de javel à 9.6%)
- Laisser agir 20 minutes puis neutraliser la javel en ajoutant 7.26 g (javel 2.6%) ou 8.08g (javel 9.6%) de thiosulfate de sodium
- Agiter jusqu'à dissolution complète.
- Laisser agir 5 minutes



- Les tubes à essais sont mis à tremper dans un bain de javel à 0.1% soit pour 1L d'eau, 38.5 ml de javel à 2.6% (ou 10.4 mL de javel à 9.6%), puis neutralisés par ajout de 7.26 g (javel 2.6%) ou 8.08g (javel 9.6%) de thiosulfate de sodium par litre d'eau.
- Laisser sécher dans une zone propre préalablement désinfectée.
- Remplir les tubes à essai propres avec 3.6 ml de milieu de culture préalablement javellisé puis neutralisé
- Filtrer 2 ml de culture sur une membrane de 3 μm grâce à un système de filtration muni d'une pompe à vide.
- Ajouter 400 μl de filtrat dans le tube correspondant à la souche filtrée.

Figure 4 : Système de filtration sous vide



d) Méthode d'isolement

- Etiqueter les tubes avec le code Souche correspondant à la souche isolée
- Prélever 2 ml de chaque souche dans un Eppendorf étiqueté avec le code Souche
- Sous la hotte, préparer 4 couvercles de boîte de Pétri (A, B, C et D) dans lesquels seront ajoutés 500 μL de milieu propre.
- Dans la boîte de Pétri A, diluer 50 μL de l'échantillon de culture.
- Placer la boîte de Pétri ouverte sous le microscope : binoculaire ou au grossissement X10
- Observer et identifier un filament à prélever
- A l'aide d'une pipette à usage unique, prélever le filament et le déposer dans la boîte de Pétri B. Répéter l'opération jusqu'à avoir 3 filaments de la morphologie souhaitée. Changer de pipette à chaque prélèvement.
- A l'aide d'une pipette, reprélever individuellement les filaments et les déposer dans la boîte de Pétri C. Changer de pipette à chaque prélèvement.
- Dans la boîte D, déposer 3 gouttes de milieu de culture avec une pipette.
- Prélever chacun des filaments isolés et les déposer dans une goutte de la boîte D, de manière à avoir un filament par goutte.
- Observer l'échantillon sur la lame afin de s'assurer que chaque filament est bien contenu dans sa goutte.
- Après vérification, prélever à nouveau chaque filament et placer les chacun dans un tube à essai distinct préalablement rempli avec du milieu.
- S'assurer que chaque filament a bien été transféré dans le tube par pipetage successif.
- Reboucher les tubes à essai avec leur coton cardé
- Placer les tubes dans l'enceinte climatique à 25°C à faible intensité lumineuse.
- Augmenter progressivement l'intensité lumineuse.

e) Repiquage et entretien



L'isolement pourra être réalisé à nouveau si besoin à partir de la 1^{ère} génération isolée selon le même protocole. De la même manière, les isolements devront être dilués à fréquence régulière afin d'assurer leur maintien.

L'ensemble des manipulations sera réalisé dans une zone propre et désinfectée à l'alcool à 70°. Les dilutions seront réalisées à partir de milieu propre (traité à la javel puis neutralisé au thiosulfate) et de matériel désinfectés soigneusement.

f) Contrôle des isolements

Dans un premier temps, les isolements seront contrôlés de manière visuelle uniquement : verdissement ou non de l'isolement.

Dès que l'échantillon montre un verdissement, il s'agira de prélever une goutte de l'isolement puis de placer la goutte sur une lame de microscope propre pour observation. Sur le prélèvement réalisé, le protocole de caractérisation sera appliqué.

Le contrôle des isolements sera réalisé toutes les deux semaines au début puis tous les mois.

2. Année 2 : Etude des performances des souches

Parmi les souches en collection, 5 ont été sélectionnées :

- P34RB
- P81AC
- E13VR
- T66CL
- MD83RR

Il s'agit dans l'ordre de deux paracas, de deux lonars et d'une spiruline droite. La sélection des souches s'est basée sur les souches les plus cultivées par la FSF.

Pour chacune de ces souches, différentes conditions de température (15-20-30-40) et d'intensité lumineuse (20-100-200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) ont été appliquées afin d'évaluer leurs performances de croissance.

Figure 5 : Dispositif expérimental des essais Performances



Les cultures ont été menées sur Spirulina medium suite à un premier échec de culture sur le milieu FSF (floculation massive), en erlen de 250 ml muni d'un bullage. L'apport de lumière est contrôlé grâce à un quantum mètre (PAR). Les cultures ont été placées en enceinte thermostatée afin d'assurer la régulation thermique.

Un classement des souches est fourni dans le tableau 3 sur la base des absorbances maximales observées.

Tableau 3 : Synthèse des résultats de performances des souches sur la base des absorbances maximales

Intensité lumineuse	20 μmol	100 μmol	200 μmol
Cycle 1 30°C	MD83RR	MD83RR / P81AC	P81AC / MD83RR
Cycle 2 30°C	P34RB / E13VR	MD83RR	MD83RR / E13VR
Cycle 3 15 puis 20°C	P81AC / P34RB	P81AC / P34RB / MD83RR	P34RB / MD83RR
Cycle 4 40°C	MD83RR	MD83RR	MD83RR / E13VR
Cycle 5 30°C	MD83RR	MD83RR	MD83RR / P34RB

Ces essais mettent en évidence des performances de croissance intéressantes pour les spirulines droites dans l'ensemble des conditions testées et principalement dans les conditions les plus extrêmes. Les paracas présentent également de bonnes performances. Les lonars quant à elles sont moins performantes mais semblent préférer des conditions d'éclairage important ($>200\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$).

Au-delà de l'effet immédiat des conditions sur les performances, la répétition des cycles à 30°C montre également un effet d'adaptation des souches aux conditions environnementales. C'est la spiruline droite qui semble la plus « malléable ».

Des caractérisations morphologiques ont été réalisées au cours de ces essais. Les écart-types de mesure sont importants, cependant, d'un point de vue microscopique, des variations ont été observées pour la souche E13VR avec un effet de la température entre le cycle 3 et le cycle 5. La photographie en figure 4 met en évidence cette variation.

Figure 6 : Photographie au microscope de la souche E13VR à 15°C (gauche) et 30°C (droite)





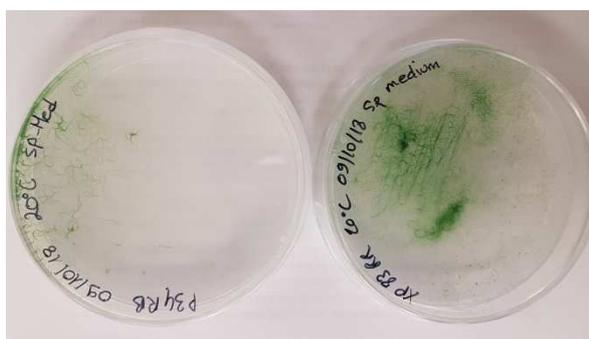
Ces essais ont fait l'objet d'un rapport de stage complet par Benoit MEURIC (2017) disponible sur le Drive du projet.

3. Année 3 : Maintien de la collection, fourniture de souches et travaux sur les droites

3.1. Maintien et optimisation de la collection

L'ensemble des 31 souches mise en collection ont été maintenues en collection sur la durée du projet et au-delà. Des essais de conservation sur milieu gélosé ont été initiés.

Figure 7 : Photographie des boîtes de Pétri ensemencées à J30



Deux méthodes d'ensemencement ont été testées, par stries à l'oese et en tapis en utilisant des billes de verre. Le volume ensemencé a été fixé à 10 μ L. L'ensemble des boîtes de pétri ont été ensuite placées à 20°C en enceinte thermostatée à faible intensité lumineuse (<5 μ mol/m²/s).

Tableau 4 : Synthèse des résultats de conservation sur milieu gélosé

	P34RB	C34GP	LA85FR	XP83RR	MD83RR	L85FR
Tapis	Croissance et morphologie préservée	Pas de croissance Trace de mortalité	Croissance et morphologie préservée	Croissance ++ enroulement des filaments	Croissance ++ et morphologie droite	Présence de patch, morphologie intacte



Stries	Croissance et morphologie préservée	Pas de croissance Trace de mortalité	Absence de croissance	Croissance ++ enroulement des filaments	ND	Présence de patch, morphologie intacte
--------	-------------------------------------	---	-----------------------	--	----	--

Les résultats obtenus sont encourageants bien que cette méthode de conservation ne semble pas convenir à tous les souches testées. En effet, la souche C34GP n'a montré aucune croissance sur milieu gélosé.

Chaque souche se développe différemment sur ce type de milieu. La souche XP83RR (paracas XXL) présente une croissance très importante qui donne lieu à des enroulements des filaments comme décrit en figure 8. La souche L85FR (Lonar) s'organise quant à elle sous forme de patches qui lui permettent de conserver sa morphologie (Figure 9).

Figure 8 : Photographie au microscope de la souche XP83RR à J30 sur milieu gélosé

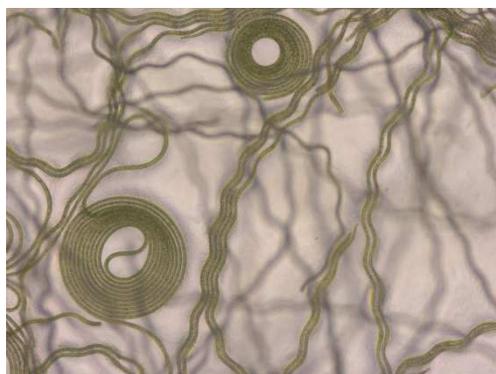
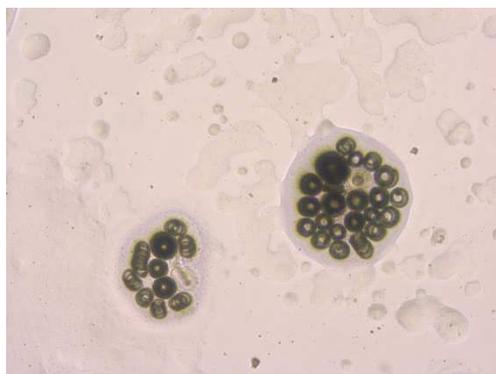


Figure 9 : Photographie au microscope de la souche L85FR à J30 sur milieu gélosé



Ces travaux seront à poursuivre et à adapter pour aboutir à un protocole commun à l'ensemble de la collection. D'autres contenants ont également été testés comme des flasques ou des tubes en plastiques jetables afin de simplifier l'entretien de la collection et réduire autant que possible les risques de contaminations. La cryopréservation serait également une technique à évaluer afin d'assurer un back-up des souches sur le long terme.

3.2. Fourniture de souches

Sur la durée du projet, le CEVA a fourni des souches avec accord de la FSF aux partenaires du projet ainsi qu'aux adhérents de la FSF. La liste des souches fournies est donnée dans le tableau 5.



Tableau 5 : Synthèse des souches fournies aux partenaires et adhérents FSF

Nom	Souche	Date	Adhérent/partenaire
Gilles PLANCHON	C34GP P34GP	21/02/2017	Adhérent et fournisseur des souches
Franck VERNIER	P34RB T66CL	06/11/2017	Adhérent
Sébastien JAUBERT	C34GP	09/07/2018	Adhérent
Christophe LEBOULANGER	P34RB E13VR L85FR	22/01/2019	Partenaire associé (Ifremer Sète)
Adrien SAUVAGEAU	P34RB E13VR	09/04/2019	Adhérent
Limnologie SARL	Collection complète sauf LA34BV	29/04/2019	Soustraitant projet
Gilles PLANCHON	C34GP	22/05/2019	Adhérent
Rémy BOSC	P34RB	27/05/2019	Adhérent

3.3. Travaux sur les droites

- Stage Carla LANTELME LOMBARDOZZI – Spiruline Atoufred (2017)

Un rapport de stage est disponible sur le Drive du projet. Le CEVA a accompagné la réalisation des essais à distance. Carla a mis en évidence l'impact de la lumière sur la proportion de droites.

- Projet Tuteuré IUT Auch « Droites »

Encadrement du projet tuteuré à distance, de mars 2017 à mars 2018. Le CEVA avec l'accord des autres partenaires a fourni deux souches isolées, une Paracas et une droite afin d'évaluer l'impact du pH, de la lumière et de l'agitation sur l'apparition des spirulines droites. La faible fréquence de suivi possible dans le cadre de l'organisation du projet tuteuré a rendu difficile le maintien des cultures. Cependant, les étudiantes impliquées semblent avoir mis en évidence un effet de la lumière (obscurité et semi-obscurité) sur la croissance des droites. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Carla en 2017.

Un rapport est disponible sur le Drive du projet.

AXE 4 : Transformation, qualité et valorisation de la spiruline produite

La contribution à l'axe 4 : Transformation, qualité et valorisation de la spiruline produite, a porté sur 3 sujets principaux :

- ✓ un état des lieux de la teneur en vitamine B12 dans la spiruline et quelles sont les communications possibles
- ✓ la mise au point d'une méthode de dosage de composés de dégradation de la chlorophylle : les phéophorbides



- ✓ Le recensement des installations de plate-forme de sous-traitance pour le séchage

1. Spiruline et vitamine B12

1.1. Contexte

Il existe depuis plusieurs années, un débat sur la nature de la vitamine B12 de la spiruline.

Récemment, l'ANSES dans sa saisine n°2014-SA-0096 relatif aux « risques liés à la consommation de compléments alimentaires contenant de la spiruline » indique spécifiquement

«l'Agence souligne que la spiruline ne constitue pas une source fiable de vitamine B12 pour les populations végétaliennes, celle-ci étant présente dans la spiruline majoritairement sous forme d'analogue inactif.».

L'académie américaine de nutrition et de diététique ainsi que les associations végétariennes américaines ou canadiennes considère que la spiruline ne constitue pas une source fiable de vitamine B12 pour les populations végétarienne et végétalienne (Melina, Craig, et Levin 2016).

Cependant, les dernières études dans les pays en voie de développement montrent que la supplémentation en spiruline peut aider à établir et corriger des déficiences en fer ou une hémoglobinémie chez les femmes enceintes et les enfants malnutris (Niang et al, 2017 ; Visnegarwala and Mahesh, 2017 ; Abed et al, 2016). L'action du fer et de la vitamine B12 sont impliqués dans ces effets aussi il est légitime de se poser la question de l'absence totale d'activité de la vitamine B12 de la spiruline chez l'homme.

Il est donc important pour les spiruliniers de connaître plus précisément les données scientifiques concernant la vitamine B12 afin de conseiller en toute confiance leurs consommateurs

1.2. Présentation de la vitamine B12

✓ **Fonction**

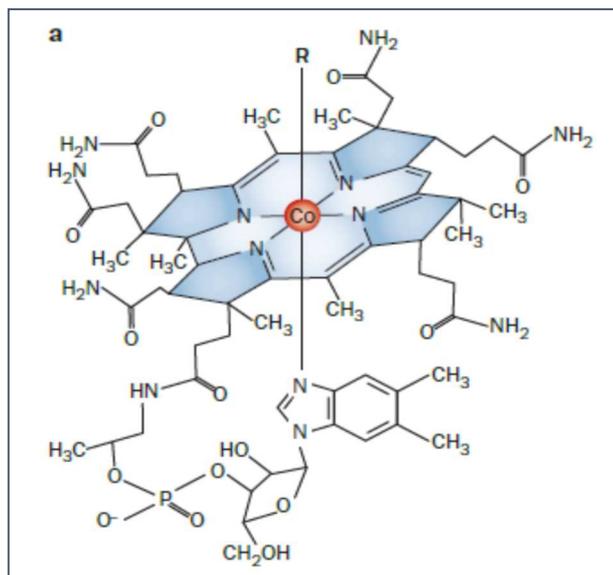
La vitamine B12 (cobalamine) est une vitamine hydrosoluble, vitale pour la croissance et la division des cellules (mitose). Elle est également nécessaire à la maturation des globules rouges, à la fonction neuronale, à la synthèse de l'ADN. A noter qu'elle intervient comme cofacteur dans certaines réactions biologiques (un cofacteur étant une substance nécessaire, en plus d'autres substances, pour mener à bien d'un processus).

✓ **Structure**

- Le terme vitamine B12 est utilisé pour décrire de manière générique toute la famille des cobalamine qui regroupe une famille de dérivés assimilables et actifs chez l'homme alors que d'autres ne le sont pas.
- Les cobalamines appartiennent à la famille des corrinoïdes : noyau de 4 cycles pyrroles avec au centre un atome de cobalt liés à 2 ligands
 - Ligand inférieure (lower α -ligand)
 - Ligand supérieur (upper β -ligand) : R sur la figure



Figure 10 : structure de la cobalamine (Nielsen & al, 2012, Chamlagain & al, 2015)



- **lower α -ligand** : conditionne l'activité chez l'homme
 - structure : 5,6 dimethylbenzimidazole ou DMBI liée à ce noyau cobalt →. Seule forme active chez l'homme. Ce DMBI joue un rôle important dans l'absorption de la B12 chez l'homme permettant la liaison spécifique de la vitamine au facteur intrinsèque de la muqueuse intestinale (transporteur glycoprotéique et la vitamine B12) (Chamlagain & al, 2016).
 - Autre ligand : Des corrinoides avec d'autres ligands sont retrouvés dans les matériaux biologiques. Ils sont biologiquement inactifs chez l'homme mais peuvent avoir une activité vitaminique chez les bactéries (Watanabe & al, 2013).
 - adénine → 7-adenyl cyanocobamide = pseudovitamine B12. inactive chez l'homme. La pseudovitamine B12 est difficilement absorbée dans l'intestin des mammifères avec une très faible affinité pour le facteur intrinsèque n: 500 fois moins qu'avec le facteur intrinsèque (Chamlagain & al, 2016).

- **Upper ligand** : conditionne la stabilité
 - groupe hydroxyl → l'hydroxocobalamine
 - groupe méthyl → la méthylcobalamine
 - résidu adénosyl, le 5-déoxyadénosyl → l'adénosylcobalamine.
 - le cyanure (-CN) → cyanocobalamine => forme la plus stable

- ✓ **Sources :**
 - La vitamine B12 n'est pas synthétisée par l'Homme et doit donc être apportée par l'alimentation. Elle est essentiellement présente dans la viande, le foie et les crustacés. Généralement absente dans les plantes, les végétariens doivent trouver une source assimilable de vitamine B12 pour éviter les carences ou les situations de subcarences.
 - Pour les usages pharmaceutiques et compléments alimentaires, la cobalamine stabilisée avec du cyanure est utilisée = cyanocobalamine



- La forme prédominante dans la viande est l'adenosylcobalamine et l'hydroxocobalamine alors que les produits laitiers contiennent principalement de la méthylcobalamine et de l'hydroxocobalamine.
- ✓ **Carences** : Plusieurs causes de carence (Watanabe & al, 2007; 2014 ; Martin, 2001 ; Chamlagain& al, 2016):
 - apport alimentaire insuffisant
 - anomalie ou déficience du facteur intrinsèque (anémie pernicieuse)
 - chirurgie de parties spécifiques de l'estomac ou de l'intestin
 - infection chronique de l'intestin grêle (ou parasites empêchant l'assimilation)
 - A noter que la carence en vitamine B12 augmente avec l'âge, du fait principalement d'une mauvaise absorption alimentaire de la vitamine
 - Conséquences :
 - Une hypovitaminose entraîne des anomalies de la division cellulaire, tout particulièrement au niveau des cellules du sang avec risques d'anémie du fait de la difficulté de synthèse de l'ADN.
 - Autres symptômes : troubles psychologiques, inflammations de la peau et des muqueuses, fatigue, pâleur (Martin, 2001).

✓ **Apports et allégations**

L'AJR ou Apport Journalier Recommandé est de **2,5 µg** : allégations possibles si - 15% AJR /100 g « source de » ou 30% AJR/100 g « riche en »

La vitamine B12 contribue (règlement (CE) n°1924/2006 et directive 90/496/CEE) :

- à un métabolisme énergétique normal
- au fonctionnement normal du système nerveux
- au métabolisme normal de l'homocystéine
- à des fonctions psychologiques normales
- à la formation normale de globules rouges
- au fonctionnement normal du système immunitaire
- à réduire la fatigue
- joue un rôle dans le processus de division cellulaire

1.3. Méthodes d'analyse

La détermination de la vitamine B₁₂ totale exige l'utilisation d'un mode de détection extrêmement sensible. Les nombreux composés analogues aux cobalamines qui ne sont pas métaboliquement actifs peuvent interférer dans les dosages. Le dosage de cette vitamine est donc complexe à mettre en oeuvre.

- Méthode microbiologique (MBA microbiological) utilisant *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 7830 (la croissance de ce microorganisme étant proportionnelle à la quantité de vitamine B₁₂ présente dans le milieu de culture) était méthode de référence AOAC (2006). Cependant c'est une méthode non spécifique, qui ne différencie pas forme active des formes inactives des corrinoïdes et acides



nucléiques. Tendance à surestimation : teneur en vitamine B12 analysée par méthode microbiologique : 6 à 9 fois plus que méthode par chemiluminescence (Watanabe, 2007) et surestimation de 5 à 30 % les formes actives (Chamlagain & al, 2015)

- Nouvelles méthodes d'analyse : basées sur des étapes d'extraction, de purification et de détection
 - Approches par affinité avec potentiellement des réactions aspécifiques ne permettant pas de différencier la vitamine vraie de la pseudovitamine : test ELISA (anticorps monoclonaux), test SPR (surface plasmon résonance, Biacore, anticorps monoclonaux).
 - Approches chromatographiques couplées ou non à de la masse (permet de différencier la vitamine vraie à la pseudovitamine).
 - HPLC et détection par fluorescence de la vitamine B12 (Pakin, Bergaentzlé, Aoudé-Werner and Hasselmann (2005). Méthode sensible mais très longue : hydrolyse enzymatique et hydrolyse alcaline avec formation de l'alpha ribazole, composé fluorescent
 - UHPLC/MS : amélioration des capacités de séparation, détection UV et vérification du composé/spectrométrie de masse (MS) (Chamlagain & al, 2015)

1.4. La vitamine B12 dans les algues

La vitamine B12 est présente exclusivement dans les viandes, les poissons et les produits laitiers. La vitamine B12 est uniquement synthétisée par certaines bactéries associées au microbiote intestinal des animaux et archaé. Les végétaux n'en contiennent donc pas : ils n'ont pas d'enzyme-cobalamine dépendantes.

Les teneurs en vitamine B₁₂ sont très variables d'un aliment à l'autre : dans les aliments naturels, de 0,9 ng.g⁻¹ pour le yaourt à 650 ng.g⁻¹ pour le foie de porc, dans les aliments complémentés, de 5 ng.g⁻¹ pour le lait vitaminé à 80 ng.g⁻¹ pour certaines préparations infantiles. Les teneurs en vitamine B₁₂ dans les aliments sont par ailleurs très nettement plus faibles que celles des autres vitamines du groupe B (Souci *et al.*, 1994).

Tableau 6 : teneur en vitamine B12 dans les aliments (Souci & al, 1994)



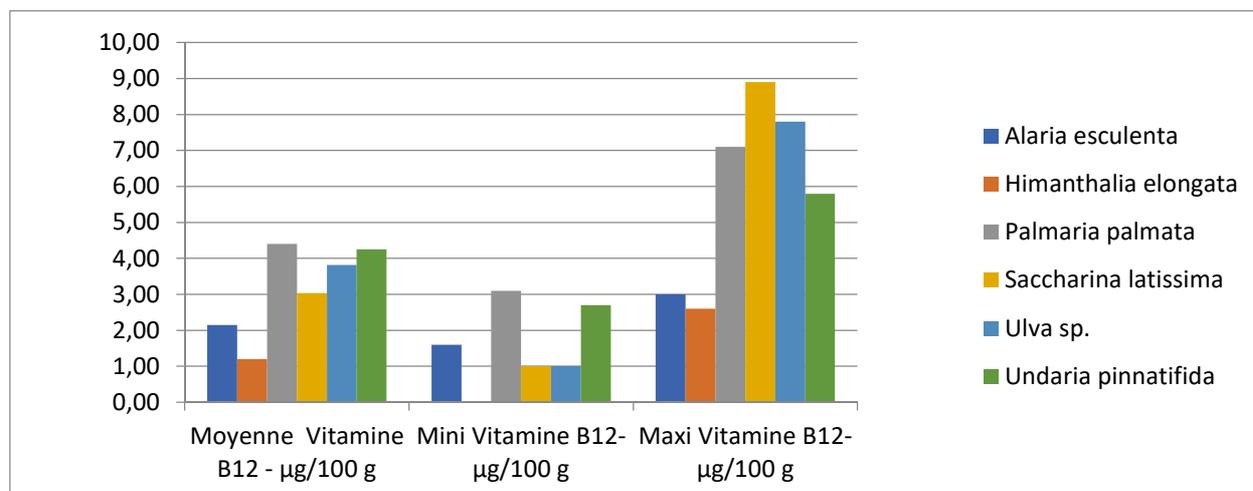
Aliment	Teneur (ng.g ⁻¹)
<i>Produits carnés</i>	
foie de bœuf	650,0
foie de porc	230-550
rognon de veau	140-400
gigot de mouton	30,0
filet de bœuf	20,0
lard	3,0-12,0
jambon	5,7-6,1
<i>Poissons, mollusques, crustacés</i>	
huître	146,0
maquereau	50,0-140
hareng	50,0-120
thon	37,0-48,0
saumon	28,9
crevette	7,3-17,1
cabillaud	4,5-12,8
<i>Produits laitiers</i>	
camembert (30% m.g.)	29,0-35,0
gruyère	20,0
œuf	8,4-31,3
fromage blanc maigre	7,5-10,0
lait entier	3,0-7,6
lait écrémé	3,0
yaourt	0,8-1,0

Dans les algues et microalgues (eucaryotes) il a été retrouvé de la vitamine B12 avec des valeurs atteignant jusqu'à 200 µg/100 g sec (Watanabe & al, 2002, Watanabe & al, 2014)

- *Enteromorpha* : environ 63µg/100g
- *Porphyra sp.* : environ 77 µg/100 g
- *Chlorella sp.* : environ 200 µg/100 g

Dans un projet récent collaboratif sur les macroalgues bretonnes, nous avons observé des valeurs de vitamine B12 variant de 1 à 9 µg/100g.

Figure 11 : Résultats d'analyse en vitamine B12 des algues bretonnes (Sensalg, CEVA 2016)





Cependant comme la plupart des méthodes analytiques sont plus ou moins sensibles et ne dosent pas toujours spécifiquement la vitamine B12 assimilable chez l'homme, on peut se poser la question de l'activité de ces vitamines B12 que l'on retrouve dans les algues.

Certaines études auraient montré que la majorité de la vitamine B12 retrouvée dans les algues n'était pas assimilable chez l'homme (Dagnelie et al, 1991).

A l'inverse certaines espèces comme le *Porphyra* contiendrait autant de vitamine B12 que le foie et a démontré sa capacité à fournir des teneurs suffisantes de vitamine B12 biodisponibles chez des consommateurs végétariens stricts (Rauma & al, 1995, Kitaaka-Katsura & al, 2002).

Un composé corrinnoïde a été purifié du nori (*Porphyra*) et identifié comme vitamine B12 (Watanabe & al, 2000). Supplémenter ce *Porphyra* à des rats déficients en vitamine B12 conduit à des résultats positifs et à une assimilation de cette vitamine B12 chez ces rats (Takenaka & al, 2001).

Enfin, de la vraie vitamine B12 a été identifiée dans la chlorelle. Les auteurs se posent la question de la culture extérieure de la chlorelle et de l'intégration de la vitamine B12 bactérienne dans le produit fini (Kittaka-Katsura & al, 2002)

En conclusion, le sujet de la vitamine B12 algale n'est pas complètement résolu à la fois sur les formes présentes et sur l'activité de ces différentes formes.

1.5. Spiruline et vitamine B12

Dans la base de données CEVA, d'après les données de la littérature, on observe une teneur moyenne de vitamine B12 dans la spiruline de **236 µg/100g** (mini : 13,7 µg/100 g à maxi = 659 µg/100g).

Cette moyenne ne provient que d'une dizaine de données (toutes méthodes d'analyse confondues).

Des auteurs démontrent que la teneur en vitamine B12 analysée par méthode microbiologique est 6 à 9 fois plus élevée que par la méthode par chimioluminescence (Herbert & Drivas, 1982)

Watanabe & al (1999) ont démontré que le pseudo B12 (7-adenyl cyanocobamide) le corrinnoïde inactif chez l'homme est la forme prédominante dans les comprimés commerciaux de spiruline et seulement 17% de vraie vitamine B12 est extraite de ces comprimés.

Cependant, plus récemment, Kumudha et al, (2010) ont purifié et caractérisé de la méthylcobalamine chez *Spirulina platensis* (35,7 µg vitamine B12 /100g sec équivalent à 71% AJR/5 g portion).

En conclusion, nous pouvons dire que :

- La majorité des formes de vitamine B12 présentes dans la spiruline sont inactives
- Mais des auteurs confirment la présence de vitamine B12 active.
 - Est-elle liée au consortium bactérien qui pousse avec la spiruline ?
 - ou la spiruline, cyanobactérie, organisme procaryote aurait-elle la capacité de synthétiser cette vitamine?
- Il est nécessaire de rester prudent sur la communication à ce jour et de **ne pas recommander** la spiruline comme **source garantie** de vitamine B12 aux personnes vegan
- Les teneurs en vitamine B12 peuvent être variables. Si une allégation est portée sur l'emballage, il est indispensable de confirmer la valeur par une analyse la plus spécifique possible
- Estimer toujours les teneurs par portion (et non pas pour 100 g sec)



1.6. Références bibliographiques

- Abed E, Ihab AN, Suliman E and Mahmoud A (2016) Impact of Spirulina on Nutritional Status, Haematological Profile and Anaemia Status in Malnourished Children in the Gaza Strip: Randomized Clinical Trial. In : Maternal and Pediatric Nutrition Journal, vol. 2, n° 110,
- Ambroise Martin. The "apports nutritionnels conseillés (ANC)" for the French population. Reproduction Nutrition Development, EDP Sciences, 2001, 41 (2), pp.119-128. ff10.1051/rnd:2001100ff. ffhal-00900366f
- Chamlagain B., Edelmann M., Kariluoto S., Ollilainen V., & Piironen V. (2015). Ultra-high performance liquid chromatographic and mass spectrometric analysis of active vitamin B12 in cells of Propionibacterium and fermented cereal matrices. Food Chemistry, 166, 630–638. [PubMed] [Google Scholar]
- Chamlagain , B , Deptula , P , Edelmann , M , Kariluoto , S , Grattepanche , F , Lacroix , C , Varmanen , P & Piironen , V 2016 , ' Effect of the lower ligand precursors on vitamin B12 production by food-grade Propionibacteria ' LWT- Food Science and Technology , vol. 72 ,pp. 117-124 . DOI: 10.1016/j.lwt.2016.04.023
- Dagnelie PC. & al.: Vitamin B-12 from algae appears not to be bioavailable. Am J Clin Nutr. 1991 Mar; 53(3):695-7.
- Herbert V, Drivas G. Spirulina and vitamin B 12. JAMA. 1982 Dec 17;248(23):3096-7.
- Herbert V.: Vitamin B-12: plant sources, requirements, and assay. Am J Clin Nutr. 1988; 48:852-8.
- Kittaka-KatsuraTomoyuki FujitaFumio WatanabeYoshihisa NakanoPurification and Characterization of a Corrinoid Compound from Chlorella Tablets as an Algal Health FoodJ. Agric. Food Chem.200250174994-4997
- Kumudha A. & al.: Purification, Identification, and Characterization of Methylcobalamin from *Spirulina platensis*. J Agric Food Chem Aug 2010.
- Melina, V., W. Craig, et S. Levin. 2016. "Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Vegetarian Diets." Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics 116 (12):1970-1980. doi: 10.1016/j.jand.2016.09.025.
- Niang, Khadim; Ndiaye, Papa; Faye, Adama; Tine, Jean Augustin Diégane; Diongue, Fatou Bintou; Camara, Maty Diagne et al. (2017) Spirulina Supplementation in Pregnant Women in the Dakar Region (Senegal). In : Open Journal of Obstetrics and Gynecology, vol. 07, n° 01, p. 147–154. DOI: 10.4236/ojog.2017.71016.
- Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CBF, et al. Vitamin B12 transport from food to the body's cells – a sophisticated, multistep pathway. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2012;9:345-54.
- Pakin C., M. Bergaentzlé, D. Aoudé-Werner, C. Hasselmann, 2005. α -Ribazole, a fluorescent marker for the liquid chromatographic determination of vitamin B12 in foodstuffs Pages 182-189. Journal of chromatography A, Volume 1081, Issue 2
- Rauma Anna-Liisa, Riitta Törrönen, Osmo Hänninen, Hannu Mykkänen, Vitamin B-12 Status of Long-Term Adherents of a Strict Uncooked Vegan Diet ("Living Food Diet") Is Compromised, The Journal of Nutrition, Volume 125, Issue 10, October 1995, Pages 2511–2515, <https://doi.org/10.1093/jn/125.10.2511> Ajouter au projet Citavi par DOI
- Souci, Fachmann, Kraut: Food Composition and Nutrition Tables 1994. medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, Germany.
- Takenaka S., Sugiyama S., Ebara S., Miyamoto E., Abe K., Tamura Y., Watanabe F. Tsuyama Y. and Nakano Y.. Feeding dried purple laver (nori) to vitamin B12-deficient rats significantly improves vitamin B12 status. British Journal of Nutrition (2001), 85, 699±703
- Tanioka Y. & al.: Methyladeninylcobamide functions as the cofactor of methionine synthase in a Cyanobacterium, *Spirulina platensis* NIES-39. FEBS Lett. 2010 Jul 16;584(14):3223-6. Epub 2010 Jun 17.
- Van Den Berg H. & al: Vitamin B-12 content and bioavailability of spirulina and nori in rats. J Nutr Biochem 1991 2:314-8.
- Visnegarwala Fehmida and Mahesh RV (2017) Spirulina: A Panacea for Iron-Deficiency Anemia of Pregnancy (A hypothesis-based Review). In : Journal of alternative medical Resaerch, vol. 3, n° 1, p. 1–3. DOI: 10.1016/j.hoc.2015.11.002



Watanabe F. & al.: Pseudovitamin B(12) is the predominant cobamide of an algal health food, spirulina tablets. *J Agric Food Chem.* 1999 Nov; 47(11):4736-41.

Watanabe F. & al.: Characterization and bioavailability of vitamin B12-compounds from edible algae. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2002 Oct; 48(5):325-31.

Watanabe F., Yabuta Y., Tanioka Y., & Bito T. (2013). Biologically active vitamin B12 compounds in foods for preventing deficiency among vegetarians and elderly subjects. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61, 6769–6775. [PubMed] [Google Scholar]

Watanabe F. Vitamin B12 sources and bioavailability. *Exp Biol Med (Maywood).* 2007 Nov; 232(10):1266-74.

Watanabe Fumio, Yukinori Yabuta, Tomohiro Bito, and Fei Teng. Vitamin B12-Containing Plant Food Sources for Vegetarians. *Nutrients.* 2014 May; 6(5): 1861–1873.



1.7. Page de communication vitamine B12 sur le site de la FSF

Sujet bien remis à l'ordre du jour ces derniers temps via l'avis ANSES auquel nous souscrivons entièrement y ayant aussi contribué *

Sujet sur lequel la FSF a toujours été à l'écoute

- ***des consommateurs, végétariens, végétans ...***
- ***et aussi des laboratoires d'analyses nutritionnelles qui fournissent des résultats pour lesquels des interprétations peuvent s'avérer nécessaires.***

Interpellés par ces discussions récurrentes, nous avons depuis 2016 soumis ce sujet à la spécialiste nutrition dans le domaine des algues Hélène Marfaing du CEVA Centre de valorisation des Algues.

Elle vient de nous restituer ce travail sous un format très scientifique que nous allons vous résumer ainsi sous format simplifié :

- les analyses B12 faites par les laboratoires jusqu'alors mesuraient la vit B12 « globale »
- La vit b12 est composée de pseudo B12 (ce n'est pas de la « fausse » B12 mais elle n'est pas assimilable par l'humain) et de B12 assimilable : les analyses ne les distinguent pas.
- A ce jour d'après les quelques analyses dont Hélène Marfaing dispose et du peu de bibliographie disponible sur la spiruline une estimation de 17% de B12 assimilable sur le total B12 a été faite par des auteurs japonais.

Dans ce cas précis, la spiruline couvrirait encore 71% des AJR pour 3 gr consommés par jour.

A partir de 30% des AJR couverts un aliment peut être qualifié de « riche en »

Nous ne pouvons pas nous contenter d'une estimation : donc oui pour les déficients en B12 une complémentation B12 de synthèse reste recommandée. Les meilleures sources naturelles restant le lait, les fromages, la viande...

Nous recherchons les laboratoires dotés des outils d'analyses permettant de mesurer la B12 assimilable et dès que nous aurons évalué avec le CEVA les laboratoires et leurs méthodes nous allons mener des campagnes d'analyses pour avoir des résultats fiables que nous publierons dès qu'ils seront connus

Merci de votre compréhension, patience, la spiruline est un bon aliment par ailleurs et les fermes françaises à votre disposition sont parmi les circuits les plus contrôlés par les pouvoirs publics

* <http://www.spiruliniersdefrance.fr/spip.php?article584>



2. Installations de séchage

Une recherche des plateformes réalisant du séchage (selon différents procédés) a été réalisée. La prise de contact a permis d'avoir des renseignements technico-économiques pour certaines plateformes. Ce répertoire permettra aux spiruliniers de faire des essais pour stabiliser leur spiruline.

A noter un contact intéressant : Hélène DESMORIEUX de l'Université de Lyon qui a encadré une thèse sur ce sujet. Intéressée pour aider à la collaboration pour améliorer le séchage de la spiruline et des microalgues en général. Mail : helene.desmorieux2@univ-lyon1.fr



Prestataire	Département	Type de sécheur	Capacité (évaporatoire)	Coût journée	Quantité minimum	Temps pour sécher 50 kg de spiruline liquide à 15% MS	Contact
Adria	29	- Cellule de séchage ARCOS : température (0/+120°C), humidité et ventilation contrôlables - Etuves	20 kg de produit	Dépend de la prestation demandée	0	Dépend du produit et des paramètres utilisés	Elise Schong elise.schong@adria.tm.fr
Aérial	67	Lyophilisateur					Benoit Duranton b.duranton@aerial-crt.com
Algosolis	44	Sécheurs Lyophilisateur					Téléphone+33 240 17 26 69
ATA – Université Montpellier 2	34	<ul style="list-style-type: none"> Sécheur cylindre Duprat Tour d'atomisation APV Tunnel de séchage Deltalab : lit fluidisé, flux traversant ou flux horizontal 	<ul style="list-style-type: none"> 4L/H de purée à 26% de MS; 5 à 13 kg/H d'eau évaporée; 500g pour le lit fluidisé, flux traversant, 2kg pour flux horizontal 		<ul style="list-style-type: none"> mini 3L mini 4L à 25%MS 		ata@univ-montp2.fr 04.99.58.50.97 http://ata.edu.umontpellier.fr/contact/
Berkem	24	1) 1 malaxeur sécheur sous vide 2) 1 sécheur à pales horizontales sous vide 3) 1 atomiseur pilote 4) 1 atomiseur de production 5) 7 lyophilisateurs	1) 100 kg 2) 100 kg 3) débit 1kg d'eau/heure 4) 100kg d'eau/h 5) 1 à 170 kg		3) 50g de MS 4) 100L de solution et capacité de 2 tonnes de liquide à atomiser/24h	Trop juste 100L minimum afin de limiter les pertes et d'avoir un rendement satisfaisant	Lucas Medjani lucas.medjani@berkem.com



Prestataire	Département	Type de sécheur	Capacité (évaporatoire)	Coût journée	Quantité minimum	Temps pour sécher 50 kg de spiruline liquide à 15% MS	Contact
Biopharma Technologies France	69	Lyophilisation et évaporation					Nathalie Mezin nathalie@biopharmatech.fr Antoine Babin antoine.babin@biopharmatech.fr 07 87 86 05 91
CEVA	22	Lyophilisateur	Batch de 30L maxi (piégeage 25 kg d'eau)	490€ HT pour les 3 jours		3 jours	Yves LELONG algae@ceva.fr 02 96 22 93 50
Comessa	67	Fournisseurs d'installations de séchage et de refroidissement + laboratoire d'essai				Séchage sous forme de pâte (égouttage/pressage nécessaire) pour atteindre environ 25% de MS	Frédéric Pron fpron@comessa.fr
Ennolys	40	Lyophilisateur	1600 KG de produit entrant à la semaine	35€ par kg de produit entrant			Pierre Tibayrenc 05 58 41 41 96
Eurolyo	28	Lyophilisateur	6 lyophilisateurs de 0,6 à 15 m ²	Facturé au traitement	À partir de 1g	66h de sublimation	Sébastien Decourtye 06 75 31 14 52 s.decourtye@eurolyo.fr
Extractis	80	Atomisation	5-50 et 100 kg/h	Sur consultation (environ 2000€)	1 à 5000L par jour	30 min à 1h	Aurélien Jubert 03 22 33 75 07



Prestataire	Département	Type de sécheur	Capacité (évaporatoire)	Coût journée	Quantité minimum	Temps pour sécher 50 kg de spiruline liquide à 15% MS	Contact
GG Coriolis	22	Atomisation	25 kg/h	400€/j (8h) + prévoir 1 journée (8h) pour nettoyage	Lots de minimum 150 L pour éviter d'avoir trop de pertes	1h42	Olivier Chavanes 06 01 47 11 78 09 77 73 83 70 olivier.chavanes@ggcoriolis.eu
Improve	80	Atomisation Lyophilisateur (sécheur à lit fluidisé pour produit poreux/fibreux)	5 kg/h. 18l/24 h	Tarifcation en fonction des demandes spécifiques		Environ 9 heures (atomisation) Environ 4 jours (lyoph)	Denis Chereau denis.chereau@improve-innov.com mob: +336 89 95 28 13
Innov'ia	17	Atomisation	Pilote de 5-10 kg/h à 70-80 kg/h équipements industriels de 150 à 600 kg/h	Tarifcation en fonction des demandes spécifiques	R&D : 2 à 20 kg par batch		Alain Grizeau 05 46 45 45 11 06 07 69 27 62 alain.grizeau@innov-ia.com
Inodry	14	Déshydratation ménagée contrôlée	Préséries : 5 à 50kg/jour Industrie : tonnes/jour				contact@inodry.com 02 31 78 99 99
IUT Saint Briec	22	Atomisation		Variable en fonction de la demande et du temps		Pas la capacité	Marie-Laure Sohier marie-laure.sohier@univ-rennes1.fr



Prestataire	Département	Type de sécheur	Capacité (évaporatoire)	Coût journée	Quantité minimum	Temps pour sécher 50 kg de spiruline liquide à 15% MS	Contact
La Salle-Beauvais Institut Polytechnique	60	Lyophilisation, zéodratation atomisation	Zéodrateur (4 kg) : séchage sous vide sans congélation	750 €/batch zéodratation			Jean-Pierre GADONNA Directeur de la Valorisation jean-pierre.gadonna@unilasalle.fr Tél. : + 33 (0)3 44 06 38 10 prestation@unilasalle.fr TEL : +33 (0)3 44 06 25 25
Lesaffre Ingrédients	50	Atomisation Séchage sous vide (tunnel en continu pour produit visqueux (>1000 cps) et thermosensible)	Tours pilote (2kg eau/h) à tours industrielles (2500 kg eau/heure) Batch : 25 kg à plusieurs tonnes				Vincent Lechevallier Directeur commercial v.lechevallier@lis.lesaffre.com
Lyofal (groupe Synerlab)	13	15 lyophilisateurs	De 5 à 800 kg	Coût au kilo humide entrant	5 kg	Environ 4-5 j sans passer par une étape de R&D	Chalotte Carbone charlotte.carbone@synerlab.com
Oniris	44	Sécheur cylindre Sécheur à lit fluidisé Tour d'atomisation Cellules de séchage					Pierre Chalois Tel : 02 51 78 54 03 relations.entreprises@oniris-nantes.fr



Prestataire	Département	Type de sécheur	Capacité (évaporatoire)	Coût journée	Quantité minimum	Temps pour sécher 50 kg de spiruline liquide à 15% MS	Contact
Prodiabio	56	- 1 tour d'atomisation - 2 lyophilisateurs - étuves (pas de ventilation) - lit fluidisé - four avec sonde sous-vide - rotavap à partir de 30°C - boule de concentration	1 L/h 2 à 3 L d'eau max/échantillon quelques mL à 2-3 L 10 à 40 L	Dépend du type de séchage, et du temps (possible à l'heure, à la ½ journée, à la journée...)	Échantillons de petites tailles Seulement de la R&D, pas de production		M. Donnart 02 97 27 82 83 kristen-tudy.donnart@univ-ubs.fr Servane Roze 02 97 27 97 68 servane.roze@univ-ubs.fr
Saint Lo There	50	Boule de concentration qui ne permet pas d'arriver au séchage total	7 kg/h	200 € HT environ	Concentration de 20 à 60 kg	Pour concentrer 60 kg de 15 à 35% il faut environ 6h	Laurent Perez laurent.perez@educagri.fr
Société des Produits G. Vernier	10	atomisation		Dépend du volume		Dépend du produit	Sophie Vernier vernier-sophie@orange.fr Mr. Vernier ste.vernierpm@wanadoo.fr
Synetude	73	Atomisation (fournisseur)	1,5L d'eau/h			28,33h	09 60 42 85 45



Prestataire	Département	Type de sécheur	Capacité (évaporatoire)	Coût journée	Quantité minimum	Temps pour sécher 50 kg de spiruline liquide à 15% MS	Contact
Techni Process	13	3 tours pilotes : 1) Tour type SD-1 2) Tour type SD 3,5 3) Tour type ME 6	1) 3 kg/h d'eau évaporée puissance : 10kW 2) 8 kg/h d'eau évaporée puissance : 22 kW 3) 20 kg/h d'eau évaporée puissance : 52 kW	1) 850 € HT 2) 1500 € HT 3) 2500 € HT Mise à disposition d'un ingénieur d'essai + utilités + rapport + nettoyage (prévoir ½ journée)	1) Tests de faisabilité / échantillonnage 2) Tests de faisabilité – rendement 3) Micro-granulation, tests, mise à production		M. Sionneau Responsable R&D 06 47 04 12 30 M. Chauvin Ingénieur Projet 06 87 84 70 53 M. Decanini Directeur Général 06 37 11 61 63
UCO	22	lyophilisateur	20 kg/batch			Environ 3 jours	Anne Jimenez Anne.jimenez@uco.fr 02 96 44 46 46
Végextra	49	Étuves à plateaux de 10 à 20kg sous vide			Pas de quantité minimum	Environ 48h (dépend de la T à laquelle on sèche)	François Steiner 02 41 83 15 31 f.steiner@vegextra.com

CENTRE D'ÉTUDE
& DE VALORISATION
DES ALGUES

ALGAE TECHNOLOGY
& INNOVATION
CENTRE

Spiruline paysanne

Contribution Axe 4 : Transformation, qualité
et valorisation de la spiruline produite

Dosage des phéophorbides

Août 2019



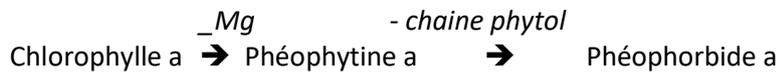
CEVA



1. Dosage des phéophorbides

1.1. Contexte

Les phéophorbides sont des produits de dégradation naturels de la chlorophylle formés par la perte de l'ion magnésium et de la queue phytol. Tous les végétaux vivants capables de photosynthèse contiennent des phéophorbides et le taux généralement augmente lorsque le végétal meurt.



Les 2 produits de dégradation : phéophytine et phéophorbide sont nommés les phéopigments.

Les phéophorbides sont assimilés, passent dans la circulation sanguine et circulent dans tout le corps. Lorsqu'ils sont exposés à la lumière, après transfert vers la peau ou tout autre organe proche de la peau, les acides gras des membranes cellulaires sont oxydés. Ceci entraîne une augmentation des ruptures membranaires et de la perméabilité capillaire provoquant érythèmes et démangeaisons (Matsuuura et al, 1982).

Du fait de cet effet photosensibilisant des phéophorbides, le ministère de la santé Japonais recommande

- une limite à **0,8 mg.g-1**, de **phéophorbides existants** dans les microalgues.
- en addition la teneur en **phéophorbides totaux** (qui peuvent potentiellement se former) est limitée à **1,2 mg.g-1**.

La teneur en phéophorbides totaux est déterminée par la même méthode que les phéophorbides existants après une étape préalable d'incubation de 3 heures à 37°C pour favoriser la conversion de la chlorophylle en phéophorbides par l'enzyme chlorophyllase potentiellement présente.

En Corée du Sud, la concentration de phéophorbide dans la poudre commerciale de Chlorella doit être inférieure à **1 mg.g-1**, soit 1 g.kg-1 (Becker, 2013).

Au Japon un phénomène important de photosensibilisation a eu lieu à Tokyo en 1977 causant dermatite et inflammation auprès de 23 consommateurs de chlorelle en comprimés (Tamura & al, 1979). Les comprimés contenaient 8,2 mg/g de phéophorbides. Un autre épisode où les phéophorbides ont été impliqués dans des cas des cas d'intoxication photosensibilisante a eu lieu plus récemment en 2005 avec des feuilles de Nori (Hwang & al, 2005).

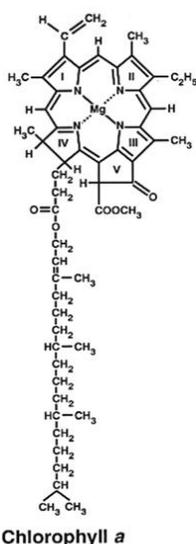
Depuis le début de la commercialisation de la spiruline, les moyennes en phéophorbides mesurées sont évaluées à 0,23 mg/g par Earthrise Farm. Généralement le problème des phéophorbides se pose plus dans la chlorelle où la teneur en chlorophylle peut atteindre 2-3% tandis qu'elle n'est que de 1% en moyenne dans la spiruline.

Aux USA, dans certains dossiers GRAS spiruline (Parry Nutraceuticals), la teneur en phéophorbide est citée (< 0,8 g/kg).

Tableau 1 : Extrait du dossier GRAS de la spiruline de Parry Nutraceuticals (cible ; méthode d'analyse et 4 lots analysés)

Phytopigments						
Total Carotenoids (mg/100 g dry wt)	400–650	Strickland and Parsons (1972). A practical Handbook of Seawater Analysis	425	434	426	420
Beta Carotene (mg/100 g dry wt)	150–250	Ranganna S. (1986). Handbook of analysis and QC for fruit & veg. Products.	162	165	164	162
Xanthophylls (mg/100 g dry wt)	250–470	In house method	263	269	262	258
Crude Phycocyanin (% dry wt)	15–19	Boussiba, S, Arch. Microbiol, 120:155 – 159, 1979	16.57	16.62	16.44	16.37
Chlorophyll-a (% dry wt)	1.23–1.67	Vonshak.A.1997. Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell biology and biotechnology.	1.48	1.49	1.42	1.39
Total Pheophorbide (% dry wt)	≤ 0.12	A. Test method for Spirulina by JHFA, Environmental Food Number 99 (1981).	0.019	0.021	0.021	0.022
Existing Pheophorbide (% dry wt)	≤ 0.08	B. Seward R. Brown. Absorption Coefficients of Chlorophyll Derivatives. J.Fish. Res. BdCanada 25 (3) 523 – 540, 1968	0.017	0.019	0.020	0.020
Light Filth (pieces/50g)	≤ 50	Richard Gorham. J. (1977). Training manual for Analytical Entomology in the food industry. FDA Tech. Bulletin No: 2	5	6	7	7

1.2. Chlorophylle : structure et sensibilité



La chlorophylle est le nom commun pour un certain nombre de dérivés tétrapyrroles présents dans les végétaux pour capter l'énergie lumineuse. Les chlorophylles sont les pigments responsables de la couleur verte caractéristique des fruits et légumes. Il n'y a pas une chlorophylle mais des chlorophylles. Les différents dérivés sont appelés chlorophylles a, b c et d.

La molécule de chlorophylle est constituée de 2 moitiés : une tête formée d'une porphyrine comprenant un atome de magnésium en son centre et d'une longue queue d'hydrocarbures ou phytol (alcool à 20 atomes de carbones).

La présence de la longue queue phytol exerce un effet déterminant sur la solubilité de la chlorophylle, la rendant pratiquement insoluble dans l'eau. Dans la plante la chlorophylle est essentiellement localisée dans les régions lipidiques des membranes chloroplastiques où elle forme des associations non covalentes avec les protéines hydrophobes (Hopkins, 2003).

La structure de la chlorophylle b est identique sauf qu'un groupement formyle (-CHO) remplace le méthyl (-CH₃) sur le cycle pyrrole II.

La principale différence entre les chlorophylles a et c est l'absence de queue phytol dans la chlorophylle c. Enfin, la chlorophylle d, qui n'est présente que dans les algues rouges, est similaire à la chlorophylle a, sauf qu'un groupement (-O-CHO) remplace le groupe (-C=CH₂) sur le noyau I (Meeks,

1974). Les chlorophylles majeures que l'on retrouve dans les plantes sont les chlorophylles a et b qui sont présentes en ratio 3:1.

La richesse des molécules de chlorophylle en doubles liaisons conjuguées entre les atomes de carbone et d'azote (=C-C= ou =C-N=) leur communique une intense coloration. En solution dans l'éther, l'acétone ou le méthanol, la chlorophylle a est bleu-vert, alors que la chlorophylle b est vert-jaune.

Tableau 2 : Distribution des différents types de chlorophylles dans les plantes et les algues (Meeks, 1974)

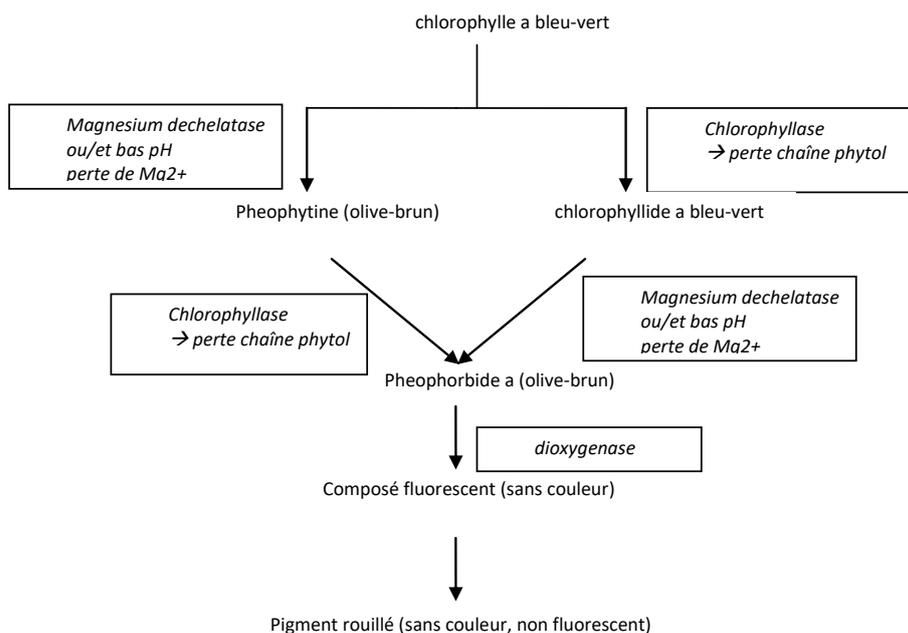
Chlorophylles	Organismes
a	Tous les organismes photosynthétiques : plantes supérieures, algues et bactéries photosynthétiques : cyanophycées et Prochlorophycées
b	Plantes supérieures, algues chlorophycées (algues vertes) et Eugénophycées, bactéries Prochlorophycées
c	Algues Phaeophycées (algues brunes), Pyrrophyccées (dinoflagellates), Bacillariophycées (diatomées), Chrysophycées, Prasinophycées et Cryptophycées
d	Chez certaines Rhodophycées (algues rouges) et Chrysophycées

Sensibilité in vivo

La chlorophylle est susceptible à de nombreuses dégradations chimiques ou enzymatiques. Les actions simultanées des enzymes, acides faibles, oxygène, lumière et chaleur peuvent entraîner la formation d'un grand nombre de produits de dégradation.

La perte de la couleur dans les tissus végétaux provoque un changement de couleur passant du vert brillant au brun olive dans les produits manufacturés et à toute une gamme de couleurs (jaune, brun, orange) dans les tissus sénescents (automne).

Figure 1 : Voies de dégradation de la chlorophylle dans les tissus végétaux. Source : Heaton and Marangoni, 1996



Sensibilité au process alimentaire

Généralement durant les process alimentaires, la couleur verte des légumes tourne au vert-olive quand ils sont chauffés ou placés en conditions acides. La conversion de la chlorophylle en phéophytine puis phéophorbide résulte en un changement de couleur du vert brillant au vert-olivâtre qui est immédiatement perçu par le consommateur comme une perte de qualité. Cette conversion a lieu facilement quand les végétaux sont chauffés ou placés en conditions acides et moins facilement à pH 7.

1.3. Dosage des phéophorbides

1.3.1. Objectifs

L'objectif de ce travail est de pouvoir proposer une méthode simple et facile à mettre en œuvre avec un spectrophotomètre pour évaluer la teneur en phéophorbides de la spiruline.

Les concentrations en chlorophylles a et en phéopigments a totaux peuvent être déterminées par des différentes méthodes : la spectrophotométrie (équations trichromatique ou équations monochromatiques de Lorenzen), la fluorimétrie, la spectrofluorimétrie, ou l'HPLC.

La méthode proposée dans cette étude est basée sur les propriétés spectrophotométriques de la chlorophylle et des différents phéopigments (phéophytine et phéophorbide) selon la méthode Aminot et Chaussepied utilisant l'équation monochromatique de Lorenzen.

Cette méthode a été initialement développée pour l'analyse des phéopigments dans des échantillons eau de mer et elle est optimisée dans cette étude pour s'appliquer à des échantillons d'algues en poudre.

Par ailleurs, l'impact des différents traitements de stabilisation des algues (lyophilisation, atomisation, étuves, frais...) sur la qualité de la spiruline et sur la teneur en phéophorbides est évaluée.

1.3.2. Principe

La chlorophylle et les phéopigments ont la même longueur d'onde maximale : 665 nm mais avec un coefficient d'absorption différent. Le rapport d'absorbance entre la chlorophylle et les phéopigments reste constant dans un solvant donné.

D'après Lorenzen (1967): pour l'acétone à 90%:

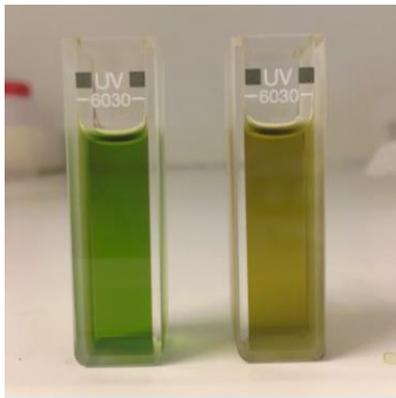
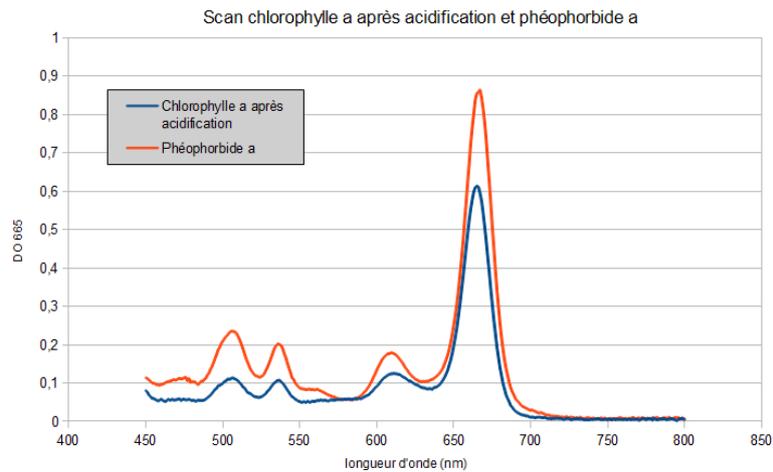
$$[\text{Chi } a] \text{ } \ddot{\text{U}}\text{lg. I-1} = 26,7 (\text{Ana665} - \text{Aa665}) \times v / (1 \times V)$$

$$[\text{Phéo } a] \text{ } \ddot{\text{U}}\text{lg.1- I} = 26,7 (1,7 \times \text{Aa665} - \text{Ana665}) \times v / (1 \times V)$$

Avec:

- v : volume d'eau de mer filtrée (litres)
- v : volume du solvant d'extraction (ml),
- 1 : longueur de la cuve utilisée dans le spectrophotomètre,
- Ana665 : Absorbance de l'extrait non acidifié mesurée à 665nm,
- Aa665 ; Absorbance de l'extrait acidifié mesurée à 665 nm.

Figure 2 : Absorbance relative de la chlorophylle et du phéophorbide



En pratique au CEVA :

- Extraction à l'acétone de l'échantillon en poudre selon le protocole classique d'extraction de la chlorophylle (double extraction ; acetone 90%)
- Après filtration, l'échantillon est acidifié pour transformer toutes les chlorophylles en phéopigments: rapport d'absorption relatif des 2 pigments constants dans le même solvant
- Mesure de l'absorbance avant et après acidification avec application de l'équation de Lorenzen

$$[\text{chlorophylle a}] = 11,4 * K * (DO_{na}^{665} - DO_a^{665}) * f$$

$$[\text{phéopigments}] = 11,4 * K * (R * DO_a^{665} - DO_{na}^{665}) * f$$

- avec : concentrations en $\mu\text{g.mL}^{-1}$
- DO_a^{665} : densité optique à 665 nm avant acidification
- DO_{na}^{665} densité optique à 665 nm après 3 minutes d'acidification
- 11,4 : lié au coefficient d'extinction spécifique de la chlorophylle a à 665 nm dans l'acétone à 90% : $\alpha = 87,67 \text{ L.g}^{-1}\text{.cm}^{-1}$
- R : rapport d'absorbance à 665 nm avant et après acidification (1,7)
- K : facteur lié à la réduction de l'absorbance à la concentration initiale en chlorophylle : $R/(R-1) = 1,7/(1,7-1) = 2,43$
- f : facteur de dilution

1.3.3. Optimisation du protocole

✓ Extraction

L'extraction a été réalisée selon le protocole du CEVA (2x2h à 4°C) en comparaison d'une extraction pendant 24h dans de l'acétone 90% à -20°C.

Tableau 3 : Comparaison des teneurs en chlorophylle et en phéopigments d'un échantillon de spiruline selon deux méthodes d'extraction différentes

	Spiruline lyophilisée	Spiruline lyophilisée + macération dans acétone 90% pendant 24h à -20°C
Teneurs en chlorophylle a (g.kg ⁻¹)	5,0	4,9
Écart-type chlorophylle a	0,01	0,05
Teneurs en phéopigments (g.kg ⁻¹)	0,8	0,7
Écart-type phéopigments	0,15	0,03

Les lectures de DO sont similaires pour les deux cas. La macération n'a pas permis d'obtenir des teneurs plus intéressantes, cette longue macération n'est donc pas essentielle pour obtenir un bon rendement d'extraction. Une observation microscopique sur un extrait de spiruline lyophilisée a montré que les cellules de chlorophylle sont éclatées. Le protocole d'extraction initial du CEVA a donc été conservé.

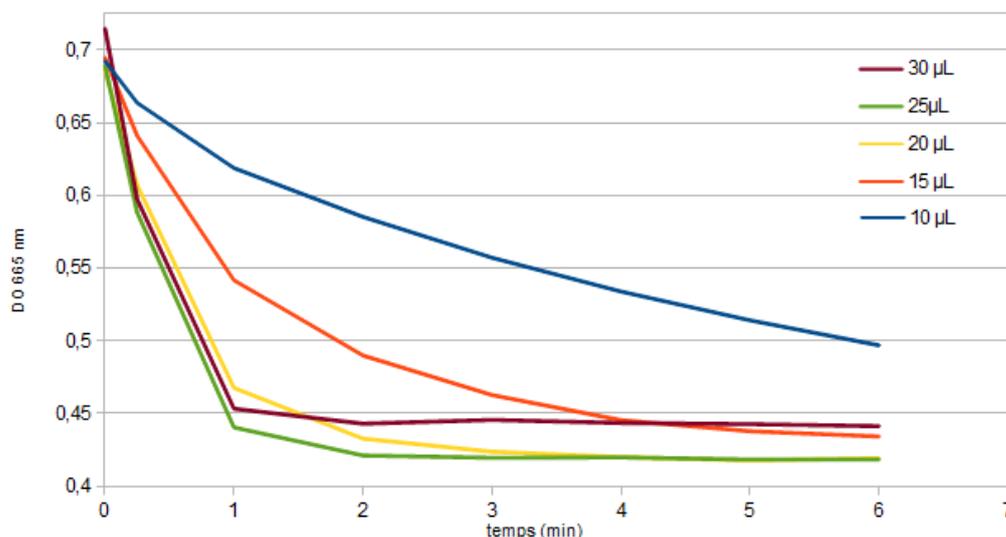
Conclusion : La suite des manipulations s'est effectuée avec l'étape classique d'extraction de 2x2h à 4°C.

✓ Taux d'acidification

Dans la littérature, l'étape d'acidification est réalisée par l'addition de 10 µL d'HCl 0,3 M par mL d'extrait et atteinte d'un pH = 2,6-2,8 Les essais ont porté sur la quantité d'acide nécessaire à la stabilisation de l'échantillon : 10-15-20-25-30 µL

Figure 3 : Suivi DO à 665 nm d'un extrait de spiruline lyophilisée après différentes acidifications

Suivi DO 665 nm extrait 2 de spiruline lyophilisée dilué 1/10 après différentes acidifications



L'acidification par 20 µL d'HCl 0,3 M est la plus intéressante, car d'après la figure le plateau se forme au bout de 3 minutes.

De plus, le rapport avant acidification/après 3 minutes d'acidification nous donne : $0,69/0,42 = 1,64$, ce qui est proche de 1,7. Le rapport d'absorption relative des deux pigments dans le même solvant est une constante. La valeur du facteur d'acidité d'un échantillon inconnu variera de 1,0 (phéopigments purs) à 1,7 (chlorophylle a pure).

Conclusion : le choix s'est porté sur l'addition de **20 µL d'HCl 0,3 M** pour une bonne stabilisation de l'échantillon sans provoquer une trop forte baisse de pH.

✓ Addition de carbonate de magnésium

Le carbonate de magnésium doit stabiliser la chlorophylle pendant la phase d'extraction dans les échantillons d'eau de mer.. Nous avons obtenu des résultats très hétérogènes et contradictoires avec l'utilisation du carbonate de magnésium sur nos échantillons en poudre. . De ce fait, nous n' avons pas ajouté cet additif qui est optionnel dans le protocole initial.

1.4. Protocole d'analyse mis au point

1.4.1. Référence à la norme.

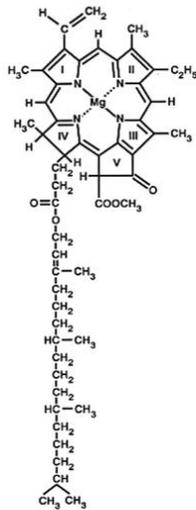
Inspiré des travaux de Aminot et Chaussepied (1983) et de la méthode de Lorenzen (1967).

1.4.2. Objet et domaine d'application.

Dosage de la chlorophylle a et des phéopigments a contenus dans la spiruline.

1.4.3. Définition du principe.

➤ Structure chimique de la chlorophylle a

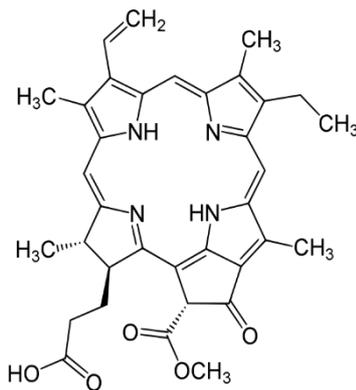


Chlorophyll a

La chlorophylle a est le principal pigment assimilateur des végétaux photosynthétiques. Ce pigment situé dans les chloroplastes des cellules végétales, intervient dans la photosynthèse pour intercepter l'énergie lumineuse, première étape dans la conversion de cette énergie en énergie chimique. Son spectre d'absorption du rayonnement lumineux est responsable de la couleur verte des végétaux ; la longueur d'onde la moins absorbée étant le vert, c'est donc cette couleur qui est perçue dans la lumière réfléchiée vers l'œil par la feuille.

Dans un premier temps, il est impératif de réaliser l'extraction de la chlorophylle a dans un solvant adapté à ce pigment et pour visée analytique (cf. extraction de la chlorophylle a, méthode ME-00). Le dosage s'effectue ensuite par spectrophotométrie.

➤ Structure chimique du phéophorbide a



Les phéophorbides sont les produits naturels de dégradation de la chlorophylle. Ils se forment lorsque le Mg et la queue phytol de la chlorophylle sont perdus, par vieillissement de la plante par exemple. La spiruline en contient en petites quantités. Ils sont photosensibilisants. En effet, ils provoquent des dermatoses lors de l'exposition de la peau à la lumière quand, la spiruline par exemple, est consommée en trop grande quantité. Il existe aujourd'hui des normes en Corée et aux USA indiquant une teneur maximum en phéopigments, il faudra acidifier l'extrait de chlorophylle obtenu pour l'analyser par spectrophotométrie.

1.4.4. Appareillage/Nettoyage

- Plaque d'agitation
- Barreau magnétique
- Pipette
- Seringue
- Filtre seringue 0,45 µm PTFE
- Pilulier en verre jaune
- Pilulier
- Spectrophotomètre
- Cuves en quartz

1.4.5. Réactifs employés, préparation et conservation.

- Acétone 90/10 (en volume) : 90 mL acétone + 10 mL d'eau UP
- Acide chlorhydrique 0,3 M : mettre de l'eau UP dans le fond d'une fiole de 50 mL, ajouter 1,24 mL d'HCl 37% et compléter avec de l'eau UP jusqu'au trait de jauge
-



1.4.6. Mode opératoire.

➤ Extraction de la chlorophylle a

- Peser 100 mg de poudre dans un pilulier de 67 mL en verre
- Y introduire 10 mL d'un mélange (acétone/eau 90/10 V/V)
- Agiter l'ensemble 2h à l'aide d'un barreau magnétique sur plaque d'agitation à 4°C et à l'abri de la lumière
- Laisser au repos 15 min puis prélever le surnageant S1 à l'aide d'une pipette
- Ajouter à nouveau sur le culot 10 mL du mélange acétone/eau (90/10)
- Réaliser une 2^{ème} extraction dans les mêmes conditions
- Prélever à nouveau le surnageant S2 à l'aide d'une pipette
- Prélever la fin du flacon à l'aide d'une seringue et filtrer sur filtre seringue 0,45 µm PTFE afin de récupérer l'extrait complet
- L'échantillon à analyser est S1+S2 dont le volume total est de 20 mL
- Les échantillons en attente du passage au spectrophotomètre sont conservés au congélateur -20°C

➤ Mesures d'absorbance

Toutes les mesures sont effectuées contre blanc acétone/eau 90/10 V/V.

L'utilisation des cuves en quartz est obligatoire car nous utilisons de l'acétone.

- Transférer 3 mL d'extrait dans la cuve du spectrophotomètre. Dilué si besoin.
- Mettre la cuve en place
- Mesurer les absorbances brutes des extraits non acidifiés à la longueur d'onde 665 nm soit DO^{na}_{665} .
- Acidifier par addition de 20 µL d'HCl 0,3 M directement dans la cuve, agiter.
- 3 minutes après acidification, mesurer les absorbances brutes des extraits acidifiés à 665 nm soit DO^a_{665}

1.4.7. Calculs et Expression des résultats.

On peut maintenant calculer les concentrations en chlorophylle a et en phéopigments a.

- [chlorophylle a] = $11,4 * 2,43 * (DO^{na}_{665} - DO^a_{665}) * f$
- [phéopigments a] = $11,4 * 2,43 * (R * DO^a_{665} - DO^{na}_{665}) * f$

avec :

- concentrations en $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
- 11,4 : facteur correspondant au coefficient d'extinction spécifique de la chlorophylle ($\alpha=87,67 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ dans l'acétone à 90 à 665 nm)
- R : rapport d'absorbance à 665 nm avant et après acidification (1,7)
- $K = R / (R - 1) = 1,7 / (1,7 - 1) = 2,43$
- f : facteur de dilution

1.4.8. Incertitude de mesures

L'incertitude de mesure a été estimée à partir d'un répliquât de la teneur en chlorophylle dans un extrait donné.

1.4.9. Limite de détection et de quantification

Limite de détection :

Limite de quantification :

1.4.10. Interférences.

RAS

1.4.11. Remarques particulières.

La conservation du standard « chlorophylle a » dans de l'acétone à 4°C et sous atmosphère inerte permet d'éviter sa dégradation via des enzymes.

1.5. Résultats

1.5.1. Influence du séchage sur la teneur en phéopigments

Un échantillon de spiruline fraîche congelée puis décongelée a été séché par trois procédés différents :

- par lyophilisation pendant 3 jours ;
- au four à 80°C ;
- au four à 50°C.

Tableau 4 : Teneur en chlorophylle et phéopigments de spiruline séchée par 3 méthodes différentes

	Spiruline lyophilisée	Spiruline séchée à 50°C	Spiruline séchée à 80°C
Teneurs en chlorophylle (g.kg ⁻¹)	5,0	4,9	3,6
Écart-type chlorophylle	0,01	0,15	0,05
Teneurs en phéopigments (g.kg ⁻¹)	0,8	0,9	1,9
Écart-type phéopigments	0,15	0,08	0,09

Conclusion : la lyophilisation préserve la chlorophylle et apparait comme la meilleure façon d'obtenir une spiruline de qualité. Cette technique de séchage permet de limiter la dégradation de la chlorophylle en phéopigments. Le séchage au four à plus faible température peut être un bon compromis également, il limite la dégradation de la chlorophylle et c'est un séchage beaucoup moins coûteux. Cependant, attention à la température choisie, certes une température plus élevée permet un séchage plus rapide mais elle conduit à une qualité de spiruline moins intéressante.

1.5.2. Echantillons producteurs

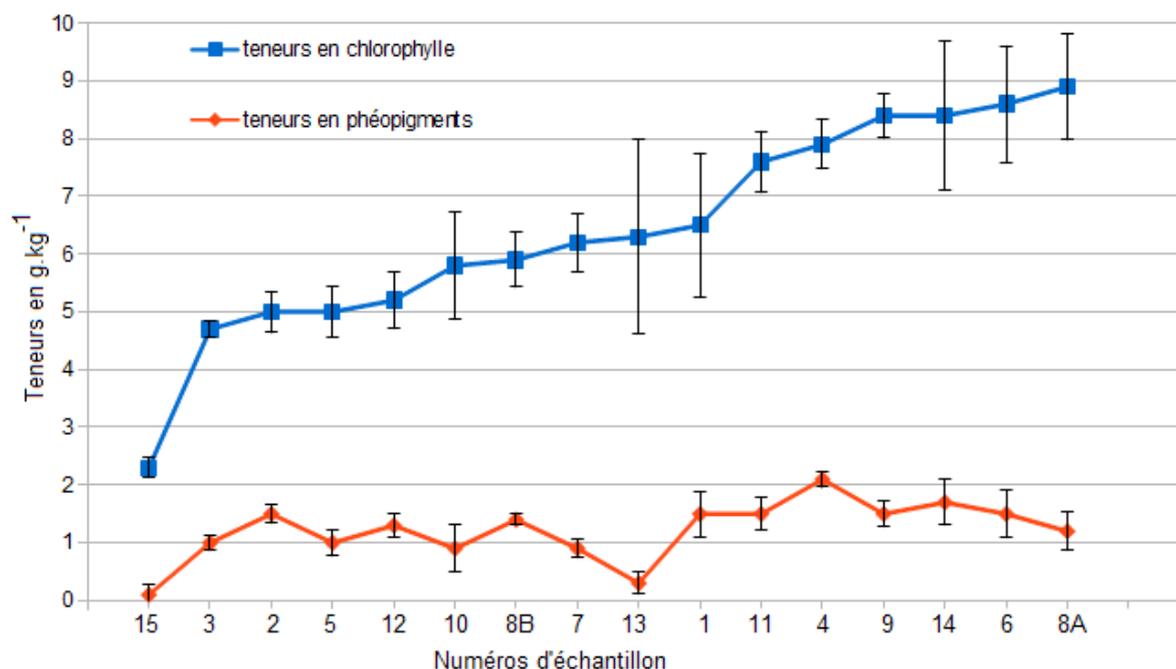
Une quinzaine d'échantillons ont été fournis par les producteurs de spiruline de la FSF répartis dans différentes régions de France afin de vérifier la teneur en phéophorbide dans leur spiruline, et donc la qualité de leur produit.

Les producteurs de spiruline sèchent leur produit de façon artisanale. Le plus souvent, ils utilisent un séchoir solaire qui permet de sécher la spiruline à basse température et à l'abri de la lumière. Certains utilisent également des séchoirs électriques. La plupart des producteurs n'ont pas recours à la lyophilisation ou à l'atomisation. C'est également pourquoi une liste de plate-forme de séchage en France leur sera proposée afin qu'ils puissent envisager un mode de séchage différent de celui qu'ils utilisent aujourd'hui.

Tableau 5 : Teneurs en chlorophylle a et en phéopigments contenus dans les échantillons de spiruline des producteurs appartenant à la FSF

Échantillon	Teneur en chlorophylle a (g.kg ⁻¹)	Ecart type chlorophylle	Teneur en phéopigments (g.kg ⁻¹)	Ecart type phéopigments
1.	6.5	1.25	1.5	0.39
2.	5.0	0.36	1,5	0.16
3.	4.7	0.13	1.0	0.13
4.	7,9	0.42	2.1	0.14
5.	5.0	0.43	1.0	0.23
6.	8.6	1.01	1.5	0.41
7.	6.2	0.51	0.9	0.16
8.A	8.9	0.92	1.2	0.33
8.B	5.9	0.47	1.4	0.09
9.	8.4	0.39	1.5	0.22
10.	5.8	0.93	0.9	0.40
11.	7.6	0.53	1.5	0.28
12.	5.2	0.49	1.3	0.19
13.	6.3	1.68	0.3	0.19
14.	8.4	1.28	1.7	0.39
15.	2.3	0.17	0.1	0.16

Figure 4 : Représentation des teneurs en chlorophylle et phéopigments des différents échantillons



Les teneurs en phéopigments de chaque échantillon sont proches de 1 g.kg⁻¹ en moyenne. Deux échantillons se démarquent :

- l'échantillon 13 –a la teneur en phéopigments la plus faible ;
- l'échantillon 4 –a la teneur la plus élevée en phéopigments.

Nous ne sommes pas en mesure de déterminer pourquoi ces valeurs sont différentes des autres. Plusieurs facteurs rentrent en compte (souche, culture, bassin, séchage...), il faudrait se rendre sur place afin de les évaluer.

L'échantillon 15 –a une teneur très faible en chlorophylle. Cet échantillon de spiruline est très foncé, et son extrait est jaune alors que les extraits de spiruline sont généralement verts avant acidification ; ce qui permet de supposer une faible teneur en chlorophylle même avant d'avoir fait le dosage. La teneur en phycocyanine doit être élevée pour avoir une couleur aussi intense.

Figure 5 : photo de l'échantillon spiruline n°15 et son extrait très jaune



Les spirulines reçues ont différentes teneurs, que ce soit en chlorophylle ou en phéopigments.

- ✓ Teneurs en chlorophylles varient de 2 à 9 g/kg
- ✓ Teneurs en phéopigments : de 0.1 à 2 g/kg

Certaines dépassent la teneur maximum autorisée en Corée du Sud pour la poudre commerciale de Chlorella qui est de 1 g.kg⁻¹.



Cependant, notre dosage par spectrophotométrie sans séparation possible des composés ne permet pas de distinguer la phéophytine du phéophorbide, tous 2 des produits de dégradation de la chlorophylle. Or, seul le phéophorbide doit être dosé car photosensibilisant.

Phéopigments = phéophytine + phéophorbide

On peut supposer que la teneur en phéophorbide est inférieure à celle de phéopigments et qu'ils respectent les limites spécifiées dans certains pays.

Ce protocole permet de screener les échantillons et de valider certains modes de stabilisation sans donner une valeur absolue de teneur en phéophorbide.

Perspectives

Une analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC) permettrait de séparer chaque composé puis de les détecter ensuite pour les doser (détection UV ou fluorimétrie). L'HPLC reste une technique de dosage pointue nécessitant un matériel onéreux et un personnel spécialisé.

1.6. Références bibliographiques

AMINOT A. & CHAUSSEPIED M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO (eds.), Brest, 395 p.

Becker, Wolfgang (2013) Microalgae in Human and Animal Nutrition. In : Amos Richmond, coord.: Handbook of Microalgal Culture. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, p. 312–351.

Heaton J.W. & A.G. Marangoni, 1996. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. *Trends in Food Science & Technology*, **7**, 8-15.

Hopkins W.G., 2003. Physiologie Végétale. De Boeck Ed.

Hwang DF, Tsai YS, Chou SS, Liu SM, Wu JT, Lin SJ, Tu WC. HPLC determination of pheophorbide a and pyropheophorbide a in dried laver product implicated in food poisoning. *J Food Hyg Soc Japan*, 2005 Apr;46(2):45-8.

Lorenzen, C.J. (1967) Determination of Chlorophyll and Pheopigments: Spectrophotometric Equations. *Limnology and Oceanography*, **12**, 343-346. <http://dx.doi.org/10.4319/lo.1967.12.2.0343>

Matsuura, E. Saito, Y. Ishida, H. , Seki, Y. et al., 1982. Toxic effects and changes of blood components by photodynamic action induced by pheophorbide-a [a chlorella-derived substance] in rats. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, Vol23, n°5, pp 365-372.

Meeks J.C., 1974. Chlorophylls. In : *Algal Physiology and Biochemistry* par William Duncan Patterson Stewart. Botanical Monographs, University of California Press.

Tamura, Y. Maki, T. Shimamura, Y. Nishigaki, S. et al.. 1979. Hygienic studies on Chlorella. I. Causal substances of photosensitivity dermatitis due to Chlorella ingestion. *Shokuhin eiseigaku zasshi Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, vol 20, n°3, pp173-180.

Projet « Spiruline Paysanne » (CAS DAR 5504)

(2015/2019)

Restitution finale des travaux de l'ITAVI



Acronyme projet	Spiruline paysanne (AMP 15003)
Commanditaire/Contact	Projet CAS DAR/ITAVI (FSF)
Date de début de projet	01/10/2015
Objet	La production de spiruline « paysanne » en France : caractérisation des procédés, qualité des produits, reconnaissance et formation
Chefs de projet ITAVI	Aurélien Tocqueville

Rédaction du rapport : Pierre Foucard, Aurélien Tocqueville ITAVI

Table des matières

Contexte	3
A- Tests d'intrants azotés et phosphatés alternatifs aux modes de culture conventionnels	4
I- Introduction	4
II- Matériel et méthodes	5
1- Site expérimental et conception des bassins de culture	5
2- Protocole de production adapté à l'échelle expérimentale	5
a- L'ensemencement	6
b- La culture	6
c- La récolte	7
d- La filtration	8
e- La presse et l'extrusion	8
f- Le séchage	9
3- Mise au point d'un outil de formulation de milieu de culture	9
a- Le milieu conventionnel : milieu FSF	9
b- Formulation de milieux alternatifs	10
c- Généralités communes aux milieux conventionnels et aux milieux alternatifs	10
4- Choix et mode d'utilisation des d'intrants azotés et phosphatés « alternatifs »	12
a- Rappel des objectifs de l'action 5 en terme d'intrants à cibler pour la labellisation « bio »	12
b- Intrants testés dans le cadre du programme	12
c- Méthodes d'apport des intrants « biologiques »	13
d- Autres modalités de culture testées	14
e- Bilan des modalités testées et formulation des milieux de culture	15
5- Paramètres suivis	17
a- Suivi de paramètres physiques et chimiques	17
b- Suivi des récoltes et de la qualité sanitaire et nutritionnelle des produits	17
6- Mise au point d'une approche bilan de masse pour comparer l'efficacité de l'utilisation de l'azote entre les modalités conventionnelles et bio	18
III- Résultats et discussions	19
1- Intérêt du suivi des cultures par le biais de la turbidité	19
2- Rendements obtenus par modalité et préconisations	20
a- Source azotée conventionnelle à base d'urée : effet mode d'apport	20
b- Source phosphatée « bio » à base d'acide phosphorique : comparaison avec source de phosphore conventionnelle	22
c- Source azotée « bio » à base d'azote ammoniacal : effet dose	22
d- Source azotée « bio » à base d'azote ammoniacal : effet du mode d'apport	26
e- Source azotée « bio » à base d'azote organique	27
f- Source azotée « alternative » à base d'effluents piscicoles (non bio)	29
g- Récapitulatif des rendements obtenus pour chaque modalité testée	32
h- Conclusion	34
3- Qualité des produits obtenus en culture biologique	35
a- Qualité nutritionnelle : bilan des données obtenues	35
b- Qualité microbiologique: bilan des données obtenues	37
c- Contaminants et toxines: bilan des données obtenues	41
d- Normes sanitaires : taux de sulfites	45
4- Efficacité de l'utilisation de l'azote : bilan de matière azoté	46
IV- Conclusion générale : préconisations	52
Bibliographie	54

Contexte

Les producteurs français de spiruline paysanne ont axé leur démarche de développement sur la durabilité des entreprises et la qualité des produits. La toute nouvelle « filière spiruline » se positionne pour une alimentation saine et des producteurs vivant décemment de leur métier.

Le projet Spiruline Paysanne vise une meilleure caractérisation des systèmes de production et une connaissance optimale du produit jusqu'à sa valorisation, afin de permettre le développement de démarches-qualité, de consolider l'accompagnement technique de la filière et la formation des producteurs.

Les objectifs poursuivis, au travers de suivis / analyses sur plusieurs fermes de références sont de :

- Mieux connaître la biologie et l'écologie de l'espèce en conditions de culture ;
- Préserver les souches actuellement cultivées : identifier, conserver et distribuer aux producteurs des variétés reconnues pour leur qualité et productivité ;
- Définir, encadrer et guider les pratiques de production, notamment par l'élaboration d'un référentiel de production artisanale Française, et aider à la finalisation du Guide des Bonnes Pratiques d'Hygiène (GBPH) ;
- Donner les éléments afin d'envisager la création d'un cahier des charges de production « spiruline biologique », en tenant compte des atouts et contraintes d'une labellisation ;
- Valoriser la production française de spiruline et proposer un produit de qualité gustative, nutritionnelle et - sanitaire conforme aux attentes des consommateurs tout en préservant les ressources et la qualité de l'environnement: amélioration continue et sensibilisation des acteurs ;
- Accompagner le transfert du savoir-faire technico-économique : guide technique, données économiques, formation professionnalisante et diplômante dans la démarche « Produisons Autrement » portée par le Ministère de l'Agriculture.

Les objectifs du projet ont été déclinés en 6 axes :

Axe 1: Procédés de culture	<ul style="list-style-type: none"> • Optimisation des milieux: sources d'azote et éléments traces • Caractérisation et définition des itinéraires techniques
Axe 2: Souches	<ul style="list-style-type: none"> • Collection de spiruline • Caractérisation et évaluation des performances des souches
Axes 3&4: Procédé, qualité et valorisation	<ul style="list-style-type: none"> • Impact du séchage et de la récolte sur la qualité des produits frais et sec • Caractérisation nutritionnelle
Axe 5: Spiruline Bio	<ul style="list-style-type: none"> • Evaluation de la faisabilité d'une culture de spiruline « biologique »
Axe 6: Formation et diffusion	<ul style="list-style-type: none"> • Accompagnement et formation de nouveaux producteurs

→ La contribution de l'ITAVI, porteur du co-porteur du projet avec la FSF, a ainsi porté sur l'ensemble des axes de travail. Son implication en termes d'expérimentations a porté en particulier sur l'axe 5, et ce en collaboration directe avec la station expérimentale ASTREDHOR-RATHO où les expérimentations ont été réalisées. Cet axe étant très liés à des notions de qualité des produits, les axes 3 et 4 ont également été abordés.

A-Tests d'intrants azotés et phosphatés alternatifs aux modes de culture conventionnels

I- Introduction

La production nationale de spiruline tend vers un fort accroissement et ce phénomène devrait s'accroître dans les années à venir. Les rendements ayant évolué de façon significative, on peut envisager une augmentation des productions en France de 50 % pour atteindre 80 tonnes en 2021. Cette croissance est liée aux capacités d'adaptation et d'innovation des producteurs et à la dynamique de recherche et de structuration menée par la FSF.

La filière est consciente de la nécessité d'encadrer les techniques de production notamment à travers la constitution d'un GBPH. Par ailleurs, en 2019, la moitié des producteurs de la FSF annonçait souhaiter passer en production labellisée ou certifiée biologique, tendance déjà observée et anticipée en 2015 lors de la constitution du dossier Spiruline Paysanne. La labellisation biologique constitue un enjeu en termes de marché pour les producteurs, face à des consommateurs de plus en plus demandeurs de produits labellisés. Elle est un enjeu également en ce qui concerne la faisabilité technique.

Pour atteindre l'objectif de production biologique, les producteurs de spiruline doivent respecter un cahier des charges qui exclue notamment l'usage d'engrais et de pesticides de synthèse, ainsi que d'organismes génétiquement modifiés. Les produits de fertilisation et de support de culture (engrais, amendements...) doivent être composés de matières premières inscrites à l'annexe I du RCE n°889/2009. Ainsi, les intrants azotés (urée, nitrate de potasse...) et phosphatés (phosphate monoammonique « (MAP) »), formes minérales utilisées conventionnellement en culture de spiruline ne sont pas autorisés en culture biologique. Les alternatives possibles sont contenues dans l'annexe I du RCE n°889/2009, intrants plutôt conçus pour l'agriculture pleine terre, et qui ne sont pas idéalement applicables dans le cadre d'une culture de microalgues. Pour être utilisés, les produits de type fumiers, composts de fumiers, litières ou autres doivent être « rendus » minéraux, afin qu'ils soient assimilables par la spiruline qui a un métabolisme principalement autotrophe. L'aspect « sanitaire » pose également question pour de la culture de spiruline où les intrants sont au contact direct du produit final.

La Fédération des spiruliniers de France (FSF) a déposé en mai 2015 à l'INAO une demande en faveur de la production de spiruline biologique. L'opportunité de lancement d'une instruction sur la reconnaissance d'un cahier des charges a été actée lors du CNAB du 4 juin 2015, mission étant donnée à la Commission nationale réglementation d'instruire cette demande. Cependant le nouveau règlement RCE n°2016/673 du 29 avril 2016 modifiant le RCE n°889/2008 (applicable au 7 mai 2017) et intégrant désormais les micro-algues - utilisées comme denrées alimentaires - à la catégorie des « algues marines » a rendu impossible l'établissement de règles nationales initialement envisagées, tout en impliquant une autre contrainte sur la nature des nutriments tolérés pour la production de spiruline, qui doivent être d'origine végétale ou minérale faiblement soluble, ce qui implique un choix encore plus restreint au sein de l'annexe I du RC N° 889/2009. Il est devenu nécessaire de porter au niveau communautaire tous les points manquants pour la production de spiruline. Le CNAB a validé le principe de l'envoi d'un dossier à la Commission européenne pour une expertise EGTOP afin de prendre en compte ces points manquants pour la culture de spiruline et il a été décidé de confier à la FSF le soin de constituer ce dossier technique. La FSF a transmis en octobre 2016 des « Propositions pour un règlement détaillé relatif à la production de spiruline biologique ». Des propositions concernaient - notamment - les intrants azotés : la culture de spiruline comme toute micro-algue

cultivée dans un milieu liquide fermé exige des formes azotées solubles et minérales pour se développer correctement tout en limitant tout risque sanitaire. La FSF envisage l'utilisation d'intrants azotés provenant de l'extraction à la vapeur (process appelé stripping) de digestat de biogaz issu de méthanisation ; toutefois il s'avère indispensable de stabiliser l'azote ammoniacal ainsi obtenu par ajout d'acide sulfurique. Le CNAB a proposé de valider ce process suite à un envoi préalable d'une note à la Commission européenne afin de confirmer la possibilité d'utilisation d'engrais solubles dans le cas spécifique de la culture de micro-algues ; ces engrais ne seraient alors utilisables que dans le cas particulier de la production de spiruline ou autres microalgues.

Si le cahier des charges actuel défini par le RCE n°889/2009 semble assez inadapté au développement d'une labellisation biologique pour la spiruline, c'est pour autant la seule approche possible en attendant que des propositions d'évolution techniquement viables soient proposées par la filière et validées par la commission européenne. Dans ce contexte, l'ITAVI a accompagné la filière Spiruline Paysanne pour sur l'action 5 du projet Spiruline Paysanne, afin (i) d'évaluer la faisabilité technique de l'utilisation de différents intrants azotés et phosphatés alternatifs aux intrants conventionnels et (2) de tester plusieurs pistes d'étude dans un cadre de culture expérimentale à échelle suffisante pour l'obtention de résultats transférables aux producteurs. Par ailleurs, l'ITAVI a également participé à l'action 4 du projet portant sur les aspects « qualité » et valorisation de la spiruline, en apportant des données sur les qualités sanitaires et nutritionnelles de la spiruline biologique en comparaison avec la spiruline produite en milieu conventionnel.

II- Matériel et méthodes

1- Site expérimental et conception des bassins de culture

La station horticole ASTREDHOR-RATHO, partenaire du projet Spiruline Paysanne, a été le siège des expérimentations menées par l'ITAVI. Un espace de production situé sous une serre en verre à simple paroi, avec possibilité de gestion automatisée des paramètres climatiques a été mis à disposition. La serre avait l'avantage d'avoir des volets mobiles, capables de s'ouvrir ou de se fermer en fonction de la température à l'intérieur de la serre. Des rideaux d'ombrage isolants permettaient par ailleurs de limiter l'intensité lumineuse en cas de rayonnement trop important, ou de conserver la chaleur en cas de température atmosphérique trop faible.

Les bassins de culture ont été conçus en structure bois et recouverts de bâches PVC alimentaire. 12 bassins de 5,55m² chacun, de forme carrée, occupaient 60m² de surface au sol. Chaque bassin avait une capacité d'accueil de 1000L de milieu de culture. Le nombre de bassins permettait de tester plusieurs modalités en parallèle, avec des répétitions pour chaque modalité (3) assurant une viabilité scientifique des résultats obtenus. Trois échantillons sont insuffisants pour effectuer des comparaisons statistiques dignes de ce nom, mais ils s'avèrent adéquats pour apprécier des « tendances » de différences entre modalités. Pour avoir un échantillon suffisamment répétable, il aurait fallu au moins 30 répétitions par modalité, ce qui n'était pas envisageable à une échelle de production suffisante pour se rapprocher des conditions de culture des producteurs. L'idée était surtout de mettre en évidence ou non des différences très marquées par modalité par rapport à des bassins témoins « conventionnels ».

2- Protocole de production adapté à l'échelle expérimentale

Les cultures expérimentales ont été conduites de manière à se rapprocher des conditions de culture que l'on trouve en production commerciale « paysanne ». L'échelle de culture était pour autant de taille limitée, en raison des contraintes de surface et de la nécessité de mettre en place de nombreux bassins pour multiplier les modalités testées. Le matériel existant et typiquement utilisé par

la filière pour les différentes étapes de production (culture, filtration, presse, extrusion, séchage) n'était pas adapté ou surdimensionnés pour cette situation expérimentale où la production de biomasse fraîche était relativement faible.

a- L'ensemencement

La souche de spiruline sélectionnée était la Paracas, souche d'origine péruvienne provenant de l'entreprise Spiru-Vie gérée par Emmanuel Gorodetzky. De la crème de spiruline a été apportée dans les milieux de culture formulés au préalable pour chaque modalité test (voir partie A-II-3 portant sur les milieux de culture). Il a été décidé d'apporter une quantité suffisante pour atteindre un secchi (indicateur de concentration de spiruline dans le milieu, exprimé en cm) d'environ 4cm. Les volumes de crème à apporter à l'ensemencement dépendent de la concentration de la crème en cellules de spiruline. A titre informatif, un volume de 80-100L de crème de spiruline a été nécessaire pour les 12 * 1000L de milieu de culture.

Un volume strictement identique a été apporté dans chaque bassin test, la crème de spiruline étant constamment brassée pour éviter que les cellules de spiruline remontent naturellement en surface, évitant ainsi tout biais dans les apports initiaux de biomasse. La crème de spiruline était au préalable systématiquement filtrée avec des mailles fines (de l'ordre du millimètre) pour éliminer les potentielles particules, résidus (matière organique, boues de fond de culture) et parasites (larves de diptères *Ephydra hians* notamment).

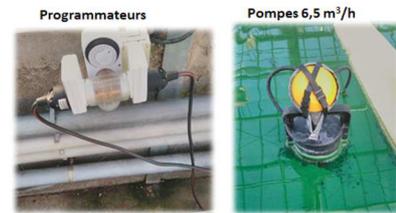
Entre chaque test, les bassins étaient vidangés et désinfectés, et le réensemencement se faisait avec la souche récupérée lors des ultimes récoltes de bassins en fin d'expérimentation précédente.

b- La culture

- La **température** visée dans le milieu de culture était au minimum de 20°C et au maximum de 40°C. Une consigne de chauffage à 20°C était réglée dans la serre via une dalle chauffante dans le cas où les températures descendraient en dessous de 20°C), consignes basées sur des travaux de **Zarrouk** et de **Vonshak** et sur les pratiques adoptées par les producteurs de spiruline en France.
- Le **pH** visé était au minimum de 9,5 à l'ensemencement, et au maximum de 11 après plusieurs récoltes (au fur et à mesure de la consommation du carbone dans le milieu par la spiruline), selon les pratiques adoptées par les producteurs de spiruline en France. Le bicarbonate de soude pouvait être utilisé pour tamponner le pH du milieu en cas de hausse excessive. Le niveau bas de pH était limité par le cahier des charges des bonnes pratiques de culture de la FSF, pour des raisons d'ordre sanitaire : en effet, le pH alcalin permet de limiter le développement d'un certain nombre de bactéries pathogènes. Par ailleurs, le pH n'est pas supposé diminuer lorsque la spiruline est en bonne santé : la consommation du CO₂ contenu dans l'eau (d'origine atmosphérique, d'origine externe par des apports de gaz carbonique, ou provenant d'une transformation de composés alcalins type carbonates ou bicarbonates) induit une hausse du pH de la solution.
- La **luminosité** incidente était au minimum de 20 klux (soit environ 200 W/m² total ou 400 μmol.m⁻².s⁻¹ PAR) et au maximum de 50 klux (soit environ 500W/m² total ou 1000 μmol.m⁻².s⁻¹ PAR). En effet, le double vitrage de la serre arrêta de base 50% du rayonnement incident extérieur, tandis que la consigne était de fermer les rideaux occultants (occultation de la lumière à hauteur de 40%) installés au dessus des bassins lorsque la luminosité extérieure atteignait 1000 W/m². Ces réglages ont été effectués sur la base de la littérature scientifique : pour des intensités lumineuses comprises entre 0 et 100 W/m², le taux de photosynthèse dépend linéairement de l'intensité lumineuse et ce taux augmente fortement même en cas de faible augmentation de l'intensité lumineuse. Entre 100 et 200 W/m² la relation de proportionnalité est moins marquée et l'activité photosynthétique augmente moins rapidement avec des intensités lumineuses croissantes.

Ensuite l'activité de la photosynthèse augmente jusqu'à atteindre un plateau, ce phénomène est la photolimitation (atteinte pour $I = 250$ à 300 W/m^2 d'après Zarrouk). D'après Barbosa et al., 2003a, la photoinhibition devient prononcée pour une intensité lumineuse supérieure à $1200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ soit environ 650 W/m^2 soit 65 % du rayonnement solaire maximal.

- Le **brassage** des milieux de culture était effectué par des pompes vide cave, de débit $6,5 \text{ m}^3/\text{h}$ en moyenne, selon le cycle de fonctionnement suivant :
 - 15 minutes de fonctionnement pour 15 minutes d'arrêt de 5h00 à 22h00
 - 15 minutes de fonctionnement pour 45 minutes d'arrêt de 22h00 à 5h00



Ce mode de brassage mimait ainsi les conditions de brassage d'une ferme voisine fonctionnant avec un système de roues à aube. Il était en effet inenvisageable d'installer un système de roue à aube sur chaque bassin pour des raisons pratiques.

- La **hauteur d'eau** était de 18 cm à l'ensemencement. Des **apports compensatoires d'eau (réseau potable)** étaient effectués régulièrement dans les milieux de culture pour combler les pertes par évaporation, l'objectif étant de toujours rester au-dessus de l'équivalent de 5% de pertes d'eau dans les bassins. L'eau étant chlorée, 1H de brassage avant ensemencement assurait l'évacuation du chlore par dégazage.
- Les **bordures bâchées des bassins étaient nettoyées** de manière hebdomadaire, à l'aide d'un jet d'eau sous pression, afin d'éviter l'agglomération de spiruline sur les bords des bassins, susceptibles d'attirer des parasites comme les diptères *Ephydra hians*.

c- La récolte

Les pompes étaient arrêtées la veille des récoltes, afin de stimuler le caractère naturel de flottaison de la spiruline, permettant une agglomération en surface. La crème de spiruline accumulée en surface était ensuite repoussée vers un bord des bassins en direction de l'opérateur - à l'aide d'un tuyau PVC légèrement lesté - avant d'être récupérée, puis acheminée sur des toiles filtrantes disposées sur des tamis.



Une récolte était effectuée dès qu'un bassin de culture présentait une valeur de secchi de 2cm. Le but étant d'atteindre Secchi 3 à 3,5cm dans chaque bassin suite aux récoltes, il était parfois nécessaire de réintégrer une part de la spiruline récoltée dans le bassin de culture jusqu'à atteindre la valeur souhaitée afin de repartir systématiquement sur un cycle de culture dans des conditions homogènes pour chaque bassin.



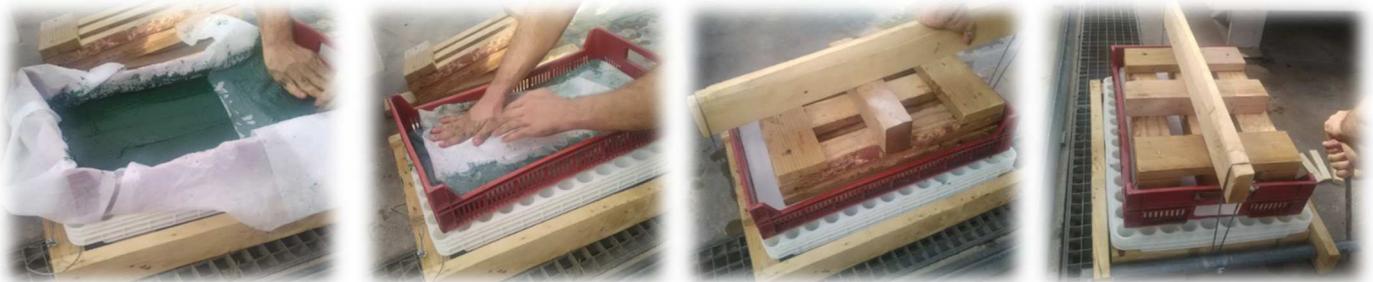
d- La filtration

Des toiles de 20µm fixés sur des tamis rectangulaires étaient utilisées pour filtrer la spiruline après récolte. L'égouttage durait 20 minutes en moyenne et l'eau filtrée retourne dans le bassin de culture.



e- La presse et l'extrusion

Une fois égouttée, la spiruline subissait une étape de presse manuelle fabriquée de manière artisanale avec un système, étant donné qu'il n'existait pas de solution « clé en main » pour des petites productions telles que pratiquées au sein de la structure expérimentale. La spiruline fraîche était ainsi maintenue dans la toile de filtration, installée dans un tamis rectangulaire, recouverte d'une plaque rigide, tandis qu'un système de levier permettait l'application d'une pression suffisante pour évacuer l'eau résiduelle de la spiruline.



L'extrusion se faisait à l'aide d'un pistolet à mastic SIKA modifié pour cette application. La biomasse pressée totale était pesée pour chaque bassin, tandis qu'un échantillon de 300g était prélevé, pesé, puis réduit sous forme de spaghettis et disposées sur des claies destinées à la phase suivante de séchage.





f- Le séchage

Le séchage se faisait à l'aide d'un déshydrateur **MODELE** à une température de 40°C pendant environ 12H. Le poids de la spiruline sèche obtenue au terme du séchage était alors consigné et rapporté à la biomasse fraîche afin d'obtenir un taux de siccité, qui était par la suite appliqué à l'ensemble de la biomasse fraîche pesée pour chaque bassin suite aux récoltes et à la phase de presse.



Le milieu de culture conventionnel qui a été choisi de pratiquer tout au long de ces six années de recherche était le milieu « Jourdan modifié » ou milieu « FSF », traditionnellement utilisé par les producteurs de spiruline en France. Ce milieu de culture est basé sur le modèle « Jourdan », lui-même adapté du modèle « Zarrouk » qui a pour défaut d'être peu économique (Jourdan, 2016). Ce milieu mise notamment sur un apport azoté initial sous forme « nitrates » par l'intermédiaire du nitrate de potasse qui apporte également le nécessaire en potassium. Cette forme azotée n'est en théorie pas la forme la plus facilement assimilable par les cyanobactéries, mais elle a l'intérêt de pouvoir être introduite en forte concentration ce qui permet d'obtenir une « réserve » en nitrates en cas de carence en azote d'origine ammoniacale ou uréique. De l'urée est également ajoutée lors de l'ensemencement, puis au fur et à mesure des récoltes. L'apport d'urée se pratique selon deux méthodes distinctes chez les producteurs français : (i) apport en fonction de la quantité de matière sèche récoltée sortie du bassin de culture à raison de 300g/kg de matière sèche récoltée (méthode que l'on nommera par la suite « apport azoté post récolte » ou AAPR) et (ii) apport journalier d'une certaine dose d'urée, variable selon les producteurs (méthode que l'on nommera par la suite « apport d'azote en dose journalière » ou « AADJ »). Les autres nutriments (phosphore, potassium, magnésium, fer, oligo-éléments) sont apportés selon le raisonnement milieu de culture/milieu de récolte.

Note :

→ On appelle « milieu de culture » le milieu de base pour chacune des modalités testées. Les apports d'intrants sont raisonnés en **volume ou poids d'intrants / m³ de culture**.

→ On appelle « milieu de récolte » la formulation d'ajout d'intrants de compensation après chaque récolte de spiruline. On raisonne ici en **volume ou poids d'intrants / kg de poids sec récoltés**.

Le tableau ci-dessous présente la formulation du « milieu de culture » conventionnel qui a été utilisé :

Apports initiaux (milieu de culture)				Concentration en nutriments							
				Azote	Carbone	Fer	Magnésium	Phosphore	Potassium	Soufre	Sodium
Produit	Formule chimique	Unité d'apport	/ 1m ³ de culture	N (mg/L)	C (mg/L)	Fer (mg/L)	Mg (mg/L)	P (mg/L)	K (mg/L)	S (mg/L)	Na (mg/L)
Bicarbonate de soude	NaHCO ₃	kg	8	/	1143	/	/	/	/	/	2190
Sel	NaCl	kg	4	/	/	/	/	/	/	/	1573
Nitrate de potasse	KNO ₃	kg	2	277	/	/	/	/	772	/	/
Sulfate de magnésie	MgSO ₄	kg	0,2	/	/	/	20	/	/	26	/
Urée	CO(NH ₂) ₂	kg	0,02	9	4	/	/	/	/	/	/
Sulfate de fer 10 gFe/L	FeSO ₄	L	0,1	/	/	1	/	/	/	/	/
Phosphate monoammonium	NH ₄ H ₂ PO ₄	kg	0,2	24	/	/	/	54	/	/	/
Oligo éléments (oligo 7)	Mix: Mn, B, Zn,	ml	10	Concentration en nutriments							
Apports complémentaires (milieu de récolte)				Azote	Carbone	Fer	Magnésium	Phosphore	Potassium	Soufre	Sodium
Produit	Element	Unité d'apport	/ kg de spiruline sèche récoltée	N (mg/L)	C (mg/L)	Fer (mg/L)	Mg (mg/L)	P (mg/L)	K (mg/L)	S (mg/L)	Na (mg/L)
Bicarbonate de soude	NaHCO ₃	kg	3	/	429	/	/	/	/	/	821
Sulfate de potasse	K ₂ SO ₄	kg	0,04	/	/	/	/	/	18	7	/
Sulfate de magnésie	MgSO ₄	kg	0,03	/	/	/	3	/	/	4	/
Urée	CO(NH ₂) ₂	kg	0,3	140	60	/	/	/	/	/	/
Sulfate de fer 10 g/L	FeSO ₄	L	0,1	/	/	1	/	/	/	/	/
Phosphate monoammonium	NH ₄ H ₂ PO ₄	kg	0,06	7	/	/	/	16	/	/	/
Oligo éléments (oligo 7)	Mix: Mn, B, Zn, Cu, Mo, Co, Se	mL	10	/	/	/	/	/	/	/	/
				Somme éléments (mg/L)							
				147	489	1	3	16	18	11	821

Pour la méthode « AADJ », la seule différence se trouve sur la ligne concernant l'urée, qui est remplacée par un apport journalier d'urée dans les bassins de culture.

b- Formulation de milieux alternatifs

Les milieux de culture « alternatifs » au milieu conventionnel « FSF » ont été formulés à l'aide d'un outil Excel permettant d'aboutir à un équilibre en nutriments très similaire aux milieux conventionnels, selon une approche AAPR ou AADJ, au cas par cas. Les feuilles de calcul prennent en compte la formulation exacte des intrants sur la base des informations fournies par les fabricants. Les masses atomiques des atomes composant les molécules en solution dans les produits, ainsi que la masse volumique des produits commerciaux sous forme liquides, ont été pris en compte pour évaluer la part relative représentée par chaque atome (N, P, K...) dans chaque produit commercial - en g/L ou en g/kg - de manière à relier ces informations aux quantités de produits (en kg ou en L) apportées dans 1000L de milieu de culture et ainsi obtenir une concentration d'élément dans le milieu de culture élaboré, en mg/L. Le but étant - pour chaque milieu « alternatif » - de s'approcher autant que faire se peut de la formulation « conventionnelle » du milieu de culture.

c- Généralités communes aux milieux conventionnels et aux milieux alternatifs

-Gestion du pH initial du milieu de culture avant ensemencement

De l'hydroxyde de sodium (NaOH) était apportée dans les milieux de culture (1,3 kg de soude/m³ de culture avec prédilution dans 10L d'eau) avant tout apport d'intrant et de spiruline, de manière à atteindre un pH de 12 et ainsi désinfecter le milieu avant de descendre le pH à 9,5 à l'aide de bicarbonate de soude et de rajouter les différents engrais. Le milieu de culture était brassé pendant

24H avant l'ajout de l'inoculum de spiruline, afin d'homogénéiser la solution nutritive, et de bien dissoudre tous les intrants. Entre chaque essai de culture, les bassins étaient vidangés et nettoyés et les milieux de culture reformulés en fonction des orientations de l'étude.

-Ordre d'ajout des nutriments

Les engrais composant le milieu de culture initial étaient ajoutés selon un ordre précis et avec des temps de repos pour permettre aux intrants de se dissoudre totalement et d'éviter des réactions entre certains éléments pouvant aboutir à la précipitation sous forme de cristaux difficilement solubles. Le tableau ci-dessous présente le protocole d'ajout de nutriment qui a été suivi à chaque création de milieu de culture.

1	Hydroxyde de sodium (1,3kg/m ³) avec prédilution de 2kg /10L eau -> pH12 12H d'agitation continue, à la veille de l'ensemencement
2	Bicarbonate de sodium -> pH 9,5/10 Chlorure de sodium 4H d'agitation continue
3	Nitrate de potasse ou Sulfate de potassium 30min d'agitation continue
4	Sulfate de magnésium 30min d'agitation continue
5	Sulfate de fer et oligo éléments 30min d'agitation continue
6	Phosphate mono-ammoniaque ou Acide phosphorique 2H d'agitation continue
7	Ensemencement spiruline

-Mix d'oligo-élément utilisé

Il a été choisi d'apporter un mix commercial d'oligo éléments, formulé par l'entreprise « Spirulina Solutions », largement utilisé par la filière et apporté à raison de 10mL/m³ dans les milieux de culture initiaux.

Composition	P/V	P/P
Bore (B)	0.799 %	0.753 %
Manganèse(Mn)	0.448 %	0.422 %
Cuivre (Cu)	0.100 %	0.094 %
Zinc (Zn)	1.020 %	0.962 %
Molybdène (Mo)	0.108 %	0.101 %
Cobalt (MO)	0.022 %	0.020 %
Acide citrique alimentaire AB, eau déminéralisée		

-Formulation de la solution de sulfate de fer chélaté

Le sulfate de fer est peu assimilable en milieu basique, tandis que les chélatés de fer existant sur le marché présentent une toxicité potentielle pour l'homme en cas d'accumulation de composés EDTA/DTPA dans le milieu, réputés peu biodégradables. En l'absence de données d'évaluation de ce type de risque en production de spiruline, il a donc été choisi de concevoir un fer chélaté à l'acide citrique, permettant ainsi une compatibilité de cette source de fer avec l'agriculture biologique. Une solution de sulfate de fer liquide à 10g/L a été formulé en mélangeant 5L d'eau avec 1 kg d'acide citrique et 335 g de sulfate de fer à 15% de Fe. L'apport dans les milieux de culture initiaux se faisait alors suite à raison de 100mL/1000L de milieu de culture pour aboutir à une concentration de 1mg/L de fer dans le milieu.

4- Choix et mode d'utilisation des d'intrants azotés et phosphatés « alternatifs »

a- Rappel des objectifs de l'action 5 en terme d'intrants à cibler pour la labellisation « bio »

L'action 5 du projet Spiruline Paysanne était formulée telle que présenté ci-dessous :

Action 5/ Vers la création d'un cahier des charges de production de « spiruline biologique »

Partenaires de l'action 5: ITAVI, FSF, FNAB

Etude sur les sources d'azote « bio »

- Acides aminés ;
- Composés ammoniacaux obtenus à l'aide de composts végétaux ou de méthanisation (stripping) ;
- Hydrolysats de plumes ;
- L'urine animale/obtention de struvites : *étude des risques, moyens de conservations, stérilisation* ;
- Filtration et utilisation de bio-digestats.

Etude sur les sources de phosphore « bio »

- Guano ;
- Phosphates issus d'os : optimisation de la confection, analyses, risques, assimilation... ;
- Phosphate alumino-calcique ;
- Scories de déphosphoration ;
- Phosphore naturel tendre.

Aspect sanitaire

- Etude de la qualité microbiologique des milieux de culture et de la spiruline avec ces procédés.

b- Intrants testés dans le cadre du programme

Entre la phase de rédaction du projet « Spiruline Paysanne » et sa phase de réalisation, le contexte réglementaire a connu des évolutions et a induit la nécessité d'abandonner les tests sur différents intrants prévus initialement tout en envisageant d'autres qui n'étaient pas prévus au départ. En effet, il est devenu obligatoire de sélectionner des intrants d'origine exclusivement végétale. Ainsi, les hydrolysats de plumes, les struvites, le guano, les phosphates issus d'os sont devenus des sources interdites en bio. Il s'est avéré problématique de trouver des fournisseurs de biodigestats ou de solutions d'acides aminés ne contenant pas de matière animale.

Par ailleurs, d'autres intrants ont été abandonnés pour des raisons d'ordre pratique - notamment l'impossibilité de trouver des fournisseurs : cela concerne le phosphate alumino-calcique, les scories de déphosphoration et le phosphore naturel tendre. Par ailleurs, ces intrants peuvent être sources de contamination des milieux en cadmium et en uranium ce qui pose des questions sur l'aspect sanitaire. Enfin, si l'utilisation de ces intrants ne posent pas de problème pour des surfaces de production agricole pleine terre, ils s'avèrent en revanche moins adaptés à la production de spiruline qui se fait en milieu liquide ; il est en effet nécessaire de solubiliser ces formes solides de phosphore, avec de l'acide formique par exemple. Or l'acide formique n'est pas explicitement autorisé en tant qu'intrant biologique.

Cela permet une nouvelle fois de constater que le cahier des charges européen du règlement 889/2009 n'est pas adapté à la situation particulière de la spiruline. L'interdiction d'utiliser des matières premières animales a empiré la situation et encore davantage limité le choix d'intrants pertinent pour de la culture biologique de spiruline.

Notons que certains intrants non prévus initialement dans le projet (et contenant une part d'acides aminés dans leur formulation, d'origine végétale uniquement) ont été testés par le biais de produits commerciaux provenant des entreprises Frayssinet et Bio3G, des intrants composés d'azote et de phosphore organique.

Le paragraphe ci-dessous présente les intrants azotés et phosphatés qui ont fait l'objet de tests dans le cadre du programme :

- **INTRANTS AZOTÉS N minéraux**

→ « **Alcali** », engrais azoté liquide à base d'ammoniac, fourni par l'entreprise Alcion et produit à l'aide d'un procédé de stripping (transfert de masse gaz-liquide) et distillation de gaz issus de digestats de méthanisation ou d'installations de compostage. Le produit commercial est composé en moyenne de 22,5% de NH_3 liquide d'environ 170,5 g/L d'azote sous forme ammoniacale. Des analyses du produit sont nécessaires avant usage et doivent être réalisés à intervalles régulières en raison du caractère instable du produit et de l'évaporation progressive de l'ammoniac.

→ « **Sulfate d'ammonium** », engrais azoté liquide à base d'ammoniac, fourni par l'entreprise Suez et produit à l'aide d'un procédé de *stripping* de l'ammoniaque volatile issu de digestats de méthanisation, stabilisés avec de l'acide sulfurique. Le produit commercial est composé d'environ 18-20% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ liquide soit 140 à 155 mg/L d'azote sous forme ammoniacale. Des analyses du produit sont nécessaires avant usage et doivent être réalisés à intervalles régulières en raison du caractère instable du produit et de l'évaporation progressive de l'ammoniac.

- **INTRANTS PHOSPHATÉS P minéraux**

→ **Acide phosphorique** », fourni par l'entreprise Agrimer, engrais phosphaté liquide extrait acide d'algues laminaires. Le produit contient 291 mg/L de phosphore.

- **INTRANTS COMPOSÉS NPK organiques**

→ **Engrais liquide Nutribio et nutrikali**, de l'entreprise Frayssinet, biostimulant nutritionnel agréé bio, 100% d'origine végétal. Les produits présentent des ratios NPK respectivement de 3-5-4 et 4-0-7 et sont composés d'extraits de protéines végétales hydrolysées ou acides aminés.

→ **Engrais liquide Isotonic B** de l'entreprise Bio3G, biostimulant nutritionnel agréé bio, 100% d'origine végétale. Le produit présente un ratio NPK de 3-1-2 et est composé de crème d'algues, substances végétales, extraits de plantes, bactéries telluriques, acides aminés.

c- Méthodes d'apport des intrants « biologiques »

Méthode d'apport des intrants à base d'azote ammoniacal

Des protocoles de tests ont tout d'abord été mis en place pour comprendre comment les intrants ammoniacaux doivent être apportés : quelle fréquence d'apport, quelle concentration d'apport... la littérature scientifique étant peu fournie sur le sujet et parfois présentant des résultats surprenants. A titre d'exemple, Belkin (1991) stipule que la spiruline peut croître à des concentrations allant jusqu'à 100 mg/L de N-NH_4 et ce à pH10, la concentration inhibitrice se situant aux alentours de 150 mg/L ce qui ne va pas dans le sens d'une autre étude (Bao, 2012) qui montre qu'un taux supérieur à 14 mg/L de N-NH_4^+ aurait un effet inhibiteur sur la croissance. Enfin, Yuan et al (2011) ont montré que le taux maximal d'intégration de l'ammoniac (en mélange avec une source de nitrates) sans observer de baisse de rendement serait de 50% suggérant ainsi que l'azote ammoniacal serait en réalité moins performant que l'azote nitrique en situation de production alors que l'azote ammoniacal est réputé comme étant la source d'azote préférentielle pour les cyanobactéries. Il est donc difficile de trouver des éléments de littérature s'accordant sur les résultats. Une autre limite étant que certaines publications évoquent des productions en milieu ouvert, d'autres en milieu fermé (photo-bioréacteur) en fonctionnement *fed batch*, *batch*, ou continu, offrant des conditions expérimentales systématiquement différentes les unes des autres, avec des milieux de culture différents, des luminosités différentes... Il a donc été nécessaire de mener nos propres tests selon une approche empirique, dans des conditions identiques à celles que connaissent les producteurs de spiruline en France.

Ainsi, l'effet dose et l'effet mode d'apport ont été testés pour les intrants alcali et sulfate d'ammonium. Les doses testées ont été, dans l'ordre chronologique : 300 mg/L de N-NH₄ équivalent azote en apport de base (sur un fonctionnement inspiré du milieu de culture conventionnel), puis des apports fractionnés journaliers de 20 mg/L, et 10 mg/L de N-NH₄ par jour. Pour une dose d'apport efficace, il a semblé utile de comparer le mode d'apport, à savoir une distribution journalière de l'intrant ammoniacal en « goutte à goutte » ou en « un seul apport = *batch* ».

Méthode d'apport de l'acide phosphorique

L'apport a été réalisé de la même manière que pour l'intrant phosphaté conventionnel, en visant une concentration dans le milieu de 52 mg/L de P. C'est l'unique mode d'apport qui a été testé.

Méthode d'apport des intrants organiques NPK

D'après la littérature, la spiruline est mixotrophe ce qui signifie qu'elle peut adopter à loisir un mode de nutrition autotrophe ou hétérotrophe (Marquez et al, 1993 ; Andrade et al, 2007 ; Barrocal et al, 2010). La culture mixotrophe pourrait présenter un intérêt en terme de rendement. Généralement les études sont orientées vers la consommation de matière organique carbonées en complément de milieux comportant de l'azote minéral directement assimilable, mais certaines études ont mis en évidence une consommation d'azote organique par la spiruline sous forme d'acides aminés [2].

Les intrants testés dans le cadre de cette étude (engrais Frayssinet et Bio3G) comportent une part d'acides aminés d'origine végétale, mais aussi d'autres matières premières d'origine végétale. L'objectif était ici de tester la faisabilité de la culture de spiruline avec ces intrants uniquement, donc sans couplage avec des intrants minéraux non autorisés en culture biologique. La littérature scientifique étant peu abondante sur ce sujet, deux modes d'apports ont été testé selon un cheminement empirique : tout d'abord un apport permettant d'atteindre des concentrations en N identique au milieu conventionnel soit un apport de base de 300 mg/L d'équivalent azote, puis des apports fractionnés journaliers de l'ordre de 10 mg d'équivalent azote/L/jour.

d- Autres modalités de culture testées

Comparaison de deux méthodes de culture « conventionnelle »

En dehors des intrants alternatifs à tester, il a également été intéressant de comparer les deux modes de cultures dits « conventionnels », AAPR et AADJ. En effet, les pratiques divergent dans la filière en ce qui concerne le mode d'apport de l'acide uréique (urée) : certains l'apportent à raison de 20 mg d'urée/L lors de l'ensemencement, puis à raison de 300g d'urée/kg de spiruline sèche récoltée (= méthode AAPR pour « apport azoté post récolte »); d'autres apportent l'urée à raison de Xmg d'équivalent azote/L de milieu de culture/jour à partir de l'ensemencement et ce sans prendre en compte la biomasse récoltée (=méthode AADJ pour « apport d'azote en dose journalière », X étant une valeur variable). Les deux modes d'apport d'urée ont été étudié en parallèle (en fixant X à 10mg d'équivalent azote/L/jour) afin d'évaluer les potentielles différences de rendement ou de qualité de produit.

Méthode d'apport de N par des effluents piscicoles

Une expérimentation menée dans le cadre du projet Spiruline Paysanne visait à évaluer en quelle mesure il serait possible de remplacer les apports d'urée effectués en culture conventionnelle par des apports d'azote nitrique (N-NO₃⁻) d'origine piscicole (et plus précisément de l'eau de surverse d'un système d'aquaponie, un procédé de phytoépuration d'effluents piscicoles par des cultures

maraiçhère associées). Cette question de recherche s'inscrit dans une thématique touchant à la filière piscicole et a pour but de limiter les rejets de pisciculture dans l'environnement. Dans cette modalité de culture (conduite avec des intrants conventionnels), aucun apport d'urée n'a été réalisé, que ce soit au lancement de la culture ou suite aux différentes récoltes. En revanche, l'apport initial de nitrate de potasse a été conservé pour éviter de trop fortes carences en azote dès le début de l'expérimentation. Le seul apport d'azote extérieur post ensemencement était l'azote contenu dans les effluents de pisciculture. L'apport était réalisé en fonction des besoins en eau dans les bassins de culture de spiruline, de manière hebdomadaire au fur et à mesure de l'évaporation du milieu de culture. En effet, la culture de spiruline nécessite un renouvellement en eau hebdomadaire en raison des fortes chaleurs en présence dans les serres de production et de l'évaporation qui en résulte : au contraire, la pisciculture consomme et rejette des eaux enrichies en nitrates, il semble donc pertinent de valoriser ces effluents d'élevage en s'en servant comme eau de renouvellement. Les effluents de pisciculture ne sont pas catégorisés comme intrant « biologique », mais l'intérêt scientifique que présente la possibilité de l'épuration d'effluents piscicoles par des microalgues/cyanobactéries a justifié les tests menés sur cette problématique.

e- Bilan des modalités testées et formulation des milieux de culture

Le tableau ci-dessous résume les différentes modalités de culture qui ont été testées durant les différentes expérimentations menées par l'ITAVI et l'ASTREDHOR-RATHO durant les trois années du programme Spiruline Paysanne. Les quantités de chaque intrant sont indiquées pour chaque modalités test auxquelles il sera fait référence dans la partie III. On distinguera trois parties : la composition du milieu de culture de base (lors de l'ensemencement), les apports effectués post récoltes (qui concernant l'ensemble des nutriments) et les apports effectués de manière journalière (raisonnés uniquement pour l'azote, modalités AADJ). Les apports du type AADJ correspondent soit à un apport de 20 mg/L d'équivalent azote (AADJ/20) soit à un apport de 10 mg/L d'équivalent azote (AADJ/10).

Intrants		Modalités											
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
Dénomination	Compatibilité "Bio"	Conventionnel "AAPR"	Conventionnel "AAD/10"	Conventionnel "AAD/10/ACP"	Bio Alcali "AAPR"	Bio Alcali "AAD/20"	Bio Alcali "AAD/10"	Bio Sulfate d'ammonium "AAD/20"	Bio Sulfate d'ammonium "AD/10"	Bio Alcali "AAD/10/GAG"	Bio Frayssinet "AAPR"	Bio Isotonic "AAD/10"	Conventionnel "Effluents piscicoles"
Composition milieu de base Unité de poids ou de volume pour 1000 L de milieu de culture													
Bicarbonate de sodium	Oui	8 kg	8 kg	8 kg	8 kg	8 kg	8 kg	8 kg	8 kg	8 kg	8 kg	8 kg	8 kg
Chlorure de sodium	Oui	4 kg	4 kg	4 kg	4 kg	4 kg	4 kg	4 kg	4 kg	4 kg	4 kg	4 kg	4 kg
Nitrate de potassium	Non	2 kg	2 kg	2 kg									2 kg
Sulfate de potassium	Oui				1,72 kg	1,72 kg	1,72 kg	1,72 kg	1,72 kg	1,72 kg	800 g	1,72 kg	
Sulfate de magnésium	Oui	200 g	200 g	200 g	200 g	200 g	200 g	200 g	200 g	200 g	200 g	200 g	200 g
Urée	Non	22 g											
Alcali	Oui				1,82 L								
Phosphate mono-ammoniaque	Non	200 g	200 g										200 g
Acide phosphorique	Incertain		180 ml	180 ml	180 ml	180 ml	180 ml	180 ml	180 ml	180 ml	180 ml	180 ml	
Intrants Frayssinet - NutriBio	Oui										2,45 L		
Intrants Frayssinet - Nutrikali	Oui										5,55 L		
Sulfate de fer (10 gFe/L)	Oui	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Oligo 7	Oui	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Compensations post récoltes (cas des modalités "AAPR") Unité de poids ou de volume par kilo de spiruline sèche récoltée													
Bicarbonate de sodium	Oui	3 kg	3 kg	3 kg	3 kg	3 kg	3 kg	3 kg	3 kg	3 kg	3 kg	3 kg	3 kg
Sulfate de potassium	Oui	40 g	40 g	40 g	40 g	40 g	40 g	40 g	40 g	40 g	40 g	40 g	40 g
Sulfate de magnésium	Oui	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g
Phosphate mono-ammoniaque	Non	60 g	60 g										60 g
Acide phosphorique	Incertain			55 ml	55 ml	55 ml	55 ml	55 ml	55 ml	55 ml	55 ml	55 ml	
Urée	Non	300											
Sulfate de fer (10 gFe/L)	Oui	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Oligo 7	Oui	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Apport d'azote journalier (cas des modalités "AAD") Unité de poids ou de volume pour 1000L de milieu de culture													
Sulfate d'ammonium	Oui							140 ml					
Alcali	Oui					120 ml			60 ml				
Urée	Non		22 g		22 g								
Intrants Bio3G - Isotonic B	Oui											305 ml	
Effluents piscicoles	Non												Compensation évaporation

5- Paramètres suivis

a- Suivi de paramètres physiques et chimiques

Le tableau ci-dessous résume les principaux paramètres concernés.

Paramètre mesuré	Unité	Fréquence	Matériel
Température de l'air	°C	En continu	Sonde fixe température, HOOGENDOORN
Luminosité (PAR)	W/m ²	En continu	Par-Mètre
Valeur de secchi	hauteur en cm	3 fois par semaine	Disque de secchi artisanal
Turbidité	NTU	3 fois par semaine	Turbidimètre PONSEL
Formes azotées (NH ₄ /NO ₂ /NO ₃)	mg/L	3 fois par semaine	Spectrophotomètre HACHLange DR 1900 OU Spectrophotomètre MACHÉREY-NAGEL PF-12.
Conductivité	mS/cm	Journalier	Sonde multiparamètre portative HACHLange HQ 40D
Température de l'eau	°C	Journalier	
Concentration en oxygène	mg/L	Journalier	
pH	/	Journalier	

En plus du suivi physico chimique décrit dans le tableau ci-dessus, un contrôle de la concentration de l'ensemble des macroéléments ainsi que du fer était réalisé afin de vérifier que la formulation des milieux alternatifs était en accord avec la formulation des témoins conventionnels. Ce contrôle était effectué par un laboratoire prestataire externe accrédité COFRAC, à savoir le laboratoire Eurofins.

Note :

La méthode de suivi la plus utilisée dans le cadre de la recherche scientifique est la lecture densité optique (DO) du milieu de culture. Cette méthode nécessite cependant du matériel coûteux (photomètre) et constitue une contrainte en terme de temps de suivi, et nécessite également un étalonnage préalable de l'équipement de suivi. Les producteurs de spiruline utilisent en général une méthode de suivi plus artisanale qui est la lecture d'une valeur de secchi dont le principe est d'immerger un disque blanc et noir muni d'une petite tige graduée, et de lire la valeur indiquée par la tige graduée lorsque l'utilisateur est incapable de distinguer la couleur blanche de la couleur noire. L'acuité visuelle et l'interprétation visuelle de l'utilisateur ont cependant un impact fort sur la valeur de secchi relevée. C'est pourquoi la turbidité a été relevée en parallèle du suivi de la valeur de secchi à l'aide d'une sonde dédiée, de manière à évaluer la faisabilité du suivi de la croissance de la spiruline par le biais de la valeur de turbidité en mesurant la corrélation qu'il y a avec la valeur de secchi pour un utilisateur donné, et ce de manière à fiabiliser le suivi des cultures en enlevant le « biais utilisateur » très fort qui est présent avec le relevé de la valeur de secchi.

b- Suivi des récoltes et de la qualité sanitaire et nutritionnelle des produits

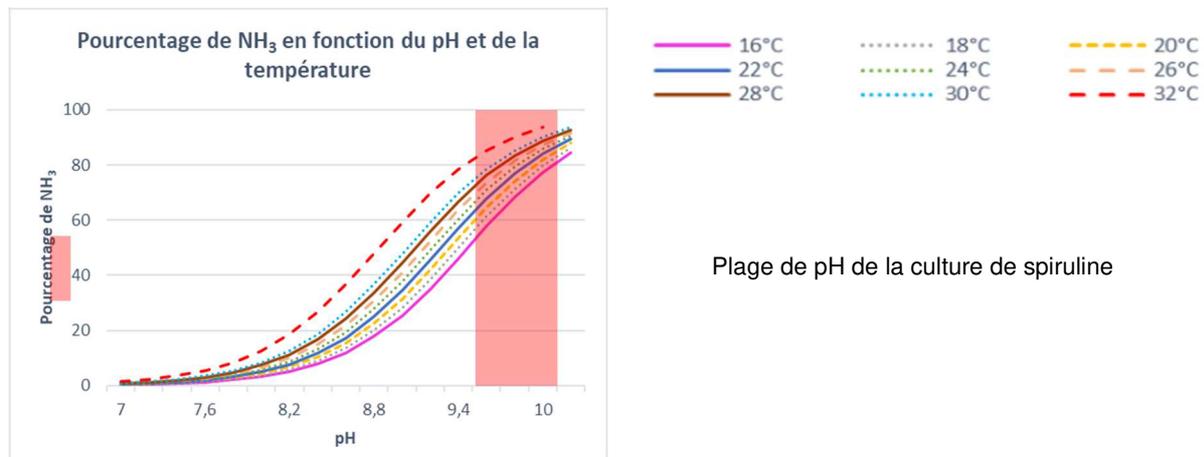
Le tableau ci-dessous résume les principaux paramètres concernés.

Paramètre mesuré	Unité	Fréquence	Matériel / Prestataire
Quantités récoltées (poids humide)	kg	A chaque récolte	Balance de précision Kern (0,1g près)
Quantités récoltées (poids sec)	kg	A chaque récolte	
Taux de siccité	%MS	A chaque récolte	/
Dénombrement cyanobactéries et dosage microcystines sur spiruline sèche et/ou sur milieu de culture	/	Analyses à T-Final	Limnologie SARL
Analyses microbiologiques sur spiruline sèche	/		Laboratoire AQMC
Analyses nutritionnelles sur spiruline sèche	/		

En plus de ce suivi, des appréciations visuelles de la couleur des milieux de culture étaient réalisées au quotidien afin d'anticiper toute problématique ayant trait aux cultures (carences nutritionnelles, phénomènes de « mort subite », ou encore toxicité de l'ammoniac...). Des observations microscopiques de la spiruline étaient réalisées régulièrement pour surveiller l'intégrité des cellules de spiruline et ainsi évaluer l'état de santé général des cultures de spiruline.

6- Mise au point d'une approche bilan de masse pour comparer l'efficacité de l'utilisation de l'azote entre les modalités conventionnelles et bio

Au cours de certains essais, des bilans de masse azoté ont été effectués. Le rôle d'un bilan de masse est d'effectuer un bilan des entrées (entrants) et des sorties (extrants) dans un système donné : le paramètre étudié dans le cadre des essais est l'azote (N) En effet, l'azote présente un enjeu particulier car ce n'est pas un élément « conservatif » contrairement à des éléments comme le phosphore (P) et le potassium (K) qui sont sous forme minérale dissoute uniquement, et qui ne peuvent pas s'évacuer du système sous forme gazeuse. Le N peut pour sa part soit être en solution (sous forme d'azote nitrique, nitreux, ammoniacal, uréique...), soit se transformer en forme gazeuse (ammoniac NH_3 , protoxyde d'azote N_2O ...) sous certaines conditions de température et de pH. L'azote ammoniacal pose particulièrement question lorsqu'il est utilisé en tant qu'intrant azoté, car son taux de dissociation en forme gazeuse NH_3 augmente proportionnellement avec le pH et la température de l'eau. Ainsi, dans les conditions « extrêmes » de culture de la spiruline (température $>32^{\circ}C$, pH >10), jusqu'à 90% de l'azote ammoniacal peut théoriquement se dissocier en forme gazeuse et donc s'évacuer du milieu de culture, d'autant plus que le brassage du milieu favorise son dégazage.



Effectuer un bilan de masse permet de mesurer (i) l'efficacité d'utilisation de l'azote par la spiruline et par la même (2) la part d'azote évacuée sous forme gazeuse dans l'atmosphère. En effet, le relargage d'azote ammoniacal et/ou de protoxyde d'azote a un impact environnemental qui nécessite d'être évalué si l'on cherche à effectuer des analyses de cycles de vie pour cette production agricole, afin de proposer des modèles plus précis et une meilleure comparaison des modes de cultures conventionnels et biologiques. Par ailleurs, certains spécialistes affirment que la spiruline pourrait potentiellement avoir la possibilité de « fixer » de l'azote d'origine atmosphérique au même titre que de nombreuses autres cyanobactéries, alors que la littérature scientifique semble montrer le contraire (Fujisawa, 2010), la spiruline ne présentant pas d'hétérocystes, cellules spécialisées dans la production de nitrogénase, enzyme capable de convertir l'azote de l'air N_2 en azote minéral. Une approche bilan de masse permet de vérifier cette hypothèse.

Ainsi, l'ensemble des sources d'azote qui rentrent dans le milieu de culture au T0 d'un essai puis au cours des ajouts ultérieurs (compensations post récolte ou apports journaliers selon les cas) sont

prises en compte pour déterminer les « entrants » du système, à la fois en quantité (kg ou L) et en concentration en azote (g/L ou g/kg) :

- Nitrate de potasse, phosphate monoammonique (MAP), urée pour le milieu conventionnel ;
- Sulfate d'ammonium, alcali, ou solution organique pour les milieux « bio » ;
- Spiruline apportée lors de l'ensemencement.

De même, l'ensemble des « extrants » du système sont évalués, à la fois en quantité (kg ou L) et en concentration en azote (g/L ou g/kg) :

- Spiruline récoltée (raisonné en masse sèche) tout au long de l'expérimentation ;
- Milieu de culture résiduel ;
- Boues résiduelles dans le milieu de culture, prises en compte dans le « milieu résiduel » en effectuant un brassage du milieu de culture en fin d'expérimentation pour faire remonter la matière organique et la mettre en suspension.

Lorsque le bilan n'est pas équilibré, il peut y avoir deux interprétations possibles :

- Si l'on retrouve moins d'extrants que d'entrants, alors des rejets azotés sous forme gazeuse ont eu lieu ;
- Si l'on retrouve moins d'entrants que d'extrants, alors une fixation d'azote atmosphérique a eu lieu.

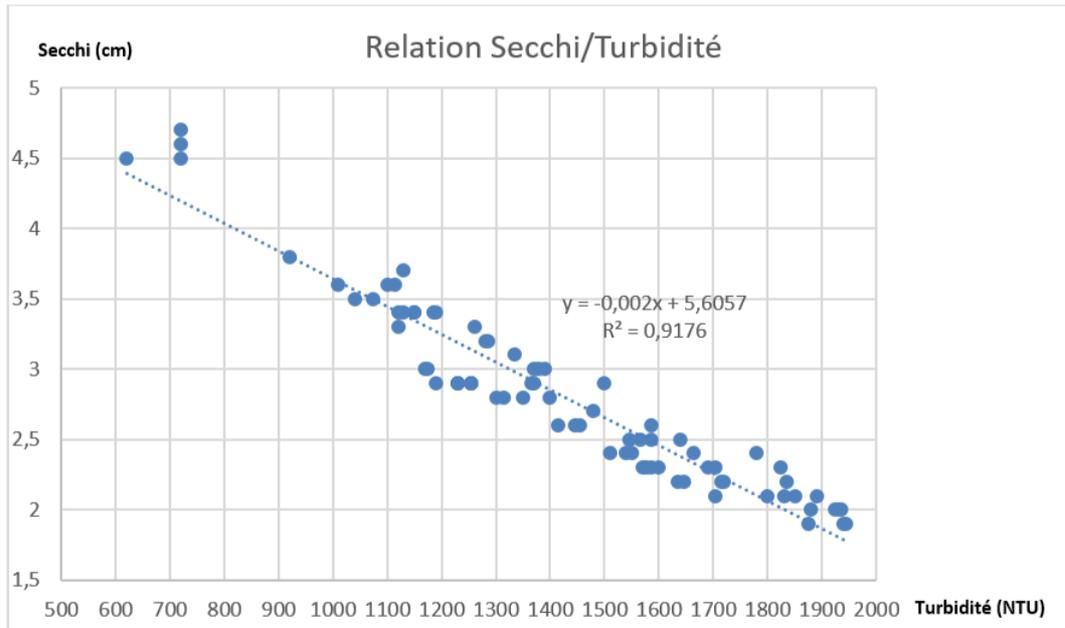
Note :

Note : Concernant la spiruline récoltée, il est estimé que les protéines contiennent en moyenne 16% d'azote, tandis que la concentration en protéines est évaluée au T-final de l'expérimentation en supposant qu'il varie peu au cours des différentes récoltes.

III- Résultats et discussions

1- Intérêt du suivi des cultures par le biais de la turbidité

Bien que pratique et rapide, la mesure de Secchi reste une approche assez imprécise de la mesure de densité de culture car affectée par la capacité de l'œil humain (différente selon les utilisateurs) et en une autre mesure par la luminosité incidente au-dessus des bassins : la répétabilité n'est pas forcément excellente selon l'utilisateur ; pour autant, cela reste la méthode de mesure la plus appliquée à l'échelle commerciale. D'autres méthodes existent, comme le suivi de la densité optique, mais cela nécessite un équipement de laboratoire onéreux (photomètre) et s'avère assez chronophage pour les producteurs. Dans le contexte des expérimentations menées par l'ITAVI, l'intérêt de l'utilisation d'un turbidimètre portatif a été évalué. La figure ci-dessous montre une bonne corrélation entre le secchi et la turbidité, pour un utilisateur donné ($R^2 > 0,9$). Il est donc envisageable de suivre l'évolution du milieu de culture par le biais de cette méthode sous réserve de s'équiper en sonde de suivi de turbidité (<600 euros).



2- Rendements obtenus par modalité et préconisations

a- Source azotée conventionnelle à base d'urée : effet mode d'apport

RÉSULTATS :

(i) **Méthode d'apport d'urée selon la méthode AAPR (apport azoté post récolte)**

L'essai mené **durant l'été 2017 (expérimentation N°1)** a permis de comparer le rendement en spiruline cultivée en milieu conventionnel et en milieux biologiques (alcali, sulfate d'ammonium et intrants organiques Frayssinet). La modalité « conventionnel AAPR » (*référéncée sous l'appellation « modalité M1 » dans la partie II-5-e*) était basée sur un mode d'apport de l'urée à raison de 300g par kilo de matière sèche de spiruline récoltée, apport réalisé suite à chaque récolte.

Rendements :

→Le rendement obtenu pour ce mode d'apport « conventionnel AAPR » est de 4,36±0,40 gMS/m²/jour.

→Les rendements obtenus en milieux biologiques sont détaillés dans la partie dédiée III-1-c.

(ii) **Méthode d'apport d'urée selon la méthode AADJ (apport azoté en dose journalière)**

L'essai mené **durant l'été 2018 (expérimentation N°3)** a permis de comparer le rendement en spiruline cultivée en milieu conventionnel et en milieux biologiques (sulfate d'ammonium et intrants organiques Isotonic B). La modalité « conventionnel AADJ/10 » (*référéncée sous l'appellation « modalité M2 » dans la partie II-5-e*) était cette fois-ci basée sur un mode d'apport de l'urée à raison d'un apport journalier correspondant à une concentration de 10mg de N/L de milieu de culture soit environ 20g d'urée par jour pour 1000L de milieu de culture. L'objectif était de procéder à un apport d'azote journalier équivalent à celui effectué pour les autres modalités, afin d'avoir une modalité « témoin » conduite de manière identique.

Rendements :

- Le rendement obtenu pour ce mode d'apport « conventionnel AADJ » n'a été que de $2,47 \pm 1,12$ gMS/m²/jour;
- Les rendements obtenus en milieux biologiques sont détaillés dans les parties dédiées III-1-c et III-1-d.

Observations :

- Le rendement de la modalité conventionnel/AADJ/10 semblait très inférieur à celui obtenu l'été précédent sur la modalité conventionnel AAPR, suggérant que le mode d'apport de l'urée pouvait avoir un impact sur le rendement de la spiruline en milieu conventionnel.

(iii) Comparaison méthodes AAPR et AADJ pour l'apport d'urée

L'essai mené durant l'été 2019 (expérimentation N°4) a permis de comparer directement l'effet des modalités « conventionnel AAPR » (référéncée sous l'appellation « modalité M1 » dans la partie II-5-e) et « conventionnel AADJ/10 » (référéncée sous l'appellation « modalité M2 » dans la partie II-5-e) sur le rendement, durant le même pas de temps et avec les mêmes conditions climatiques.

Rendements :

- Le mode d'apport de l'urée n'implique aucune différence significative sur le rendement, la modalité « conventionnel AAPR » offrant un rendement de $3,04 \pm 0,45$ gMS/m²/jour contre $3,43 \pm 0,02$ gMS/m²/jour avec la modalité « conventionnel AADJ / 10 ».

Observations :

- Il est intéressant de noter toutefois que l'évolution des formes azotées dans le milieu est différente selon le mode d'apport de l'urée.
 - ✓ Avec la méthode AAPR, le taux de nitrates tend à diminuer au cours du temps
 - ✓ Avec la méthode AADJ, le taux de nitrates tend à augmenter au cours du temps

DISCUSSION sur le mode d'apport de l'urée:

Le mode d'apport de l'urée n'impacte pas significativement le rendement en culture de spiruline, on peut indifféremment apporter l'urée en compensation post récolte à raison de 300g d'urée/kg de spiruline récoltée (« conventionnel AAPR »), ou l'apporter de manière progressive à raison de 10 mg d'équivalent azote/L/jour (« conventionnel AADJ »). Par ailleurs, les concentrations en azote ammoniacal n'ont pas atteint des valeurs excessives pour la modalité conventionnel AAPR par rapport à la modalité AADJ, ce qui laisse penser que l'urée se métabolise non pas de manière spontanée, mais de manière progressive dans le milieu de culture, se comportant ainsi comme une forme de réserve d'azote.

L'augmentation du taux de nitrates dans la modalité conventionnel AADJ suggère un apport d'azote en excès, et donc que l'urée apportée dans le milieu finit par se retrouver au moins en partie sous forme de nitrates qui s'ajoute au stock de départ apporté par le nitrate de potasse apporté dans le milieu de culture initial (augmentation du stock d'azote nitrique de 100 à 120% en deux mois sur l'essai 2017). Au contraire, la méthode conventionnel AAPR semble induire une consommation de cette « réserve » en nitrates (diminution du stock d'azote nitrique de 40% en trois mois sur l'essai 2017) ce qui suggère que l'azote uréique est apporté de manière insuffisante ce qui peut au terme de plusieurs mois induire une carence azotée.

- b- Source phosphatée « bio » à base d'acide phosphorique : comparaison avec source de phosphore conventionnelle

RÉSULTATS :

(i) Comparaison apports MAP ou acide phosphorique sur modalité « conventionnel ADJ »

-L'essai mené **en été 2018 (expérimentation N°2)** a permis de tester l'impact de la source de phosphore (MAP ou acide phosphorique) sur la productivité de la spiruline cultivée selon le mode de culture conventionnel. Les modalités testées étaient la modalité « conventionnel AADJ/10 » (référéncée sous l'appellation « modalité M2 » dans la partie II-5-e) et la modalité « conventionnel AADJ/10/AcP » (référéncée sous l'appellation « modalité M3 » dans la partie II-5-e) qui avait pour seule différence de remplacer la source de phosphore habituelle des milieux conventionnels (MAP) par de l'acide phosphorique.

Rendements :

→Il n'y a aucune différence significative sur le rendement en spiruline entre les deux intrants phosphatés, la modalité « conventionnel AADJ/10 » offrant un rendement de $2,47 \pm 1,12$ contre un rendement de $2,48 \pm 1,14$ pour la modalité « conventionnel AADJ/10/AcP ».

Observations :

DISCUSSION sur la source de phosphore :

L'acide phosphorique extrait d'algue laminaire peut aisément remplacer le MAP pour cultiver de la spiruline. Il subsiste toutefois des doutes sur la compatibilité réelle de cet intrant avec le label biologique, le mode de formulation de cet engrais n'étant pas très détaillé par le fournisseur mais implique a priori l'utilisation d'acides forts pour sa fabrication. Des démarches devront être entreprises pour s'en assurer tandis que des alternatives doivent être étudiées.

- c- Source azotée « bio » à base d'azote ammoniacal : effet dose

RÉSULTATS :

(i) Méthode d'apport de N-NH₄ selon un équivalent azote similaire au milieu conventionnel AA

-Durant **l'été 2017 (Expérimentation N°1)**, un test a été réalisé sur une modalité d'apport d'alcali « Bio alcali/AAPR » (référéncée sous l'appellation « modalité M4 » dans la partie II-5-e) correspondant à des concentrations en azote total similaire à ce que l'on peut trouver dans le milieu de culture « conventionnel AAPR » à savoir environ 300 mg/L d'azote au moment de l'ensemencement.



Observations :

→ L'essai portant sur cette méthode d'apport de l'ammoniaque s'est soldé par un échec, la spiruline a été rapidement détruite rendant le milieu totalement blanc en trois jours (voir photo ci-contre).

→ Il a été décidé de poursuivre les essais avec ces intrants en adoptant une stratégie d'apport fractionnés, de manière journalière.

(ii) **Méthode d'apport d'azote en dose journalière de 20mg de N-NH₄/L/jour**

-L'essai mené **en été 2017 (expérimentation N°1)** a permis de comparer le rendement obtenu en milieu conventionnel d'une part, et en milieu biologique à base d'azote ammoniacal (alcali et sulfate d'ammonium) d'autre part. La source de phosphore pour la modalité conventionnelle était du MAP tandis que la source de phosphore « bio » était de l'acide phosphorique. Les intrants azotés bio étaient apportés tous les jours dans les milieux « bio » à raison de 20mg de N-NH₄⁺/L/jour en un seul apport. Les modalités d'apports de l'azote par l'alcali et par le sulfate d'ammonium ont été nommées respectivement « modalité bio/alcali/AADJ/20 » (référéncée sous l'appellation « modalité M5a » dans la partie II-5-e) et « modalité bio/sulfate d'ammonium/AADJ/20 » (référéncée sous l'appellation « modalité M6a » dans la partie II-5-e), tandis que la modalité témoin était menée selon la méthode « conventionnel AAPR » (référéncée sous l'appellation « modalité M1 » dans la partie II-5-e).

Rendements :

→ La modalité « conventionnel AAPR » a donné un rendement s'élevant à 4,36±0,40 gMS/m²/jour

→ La modalité « bio alcali/AADJ/20 » a donné un rendement s'élevant à 2,56±1,41 gMS/m²/jour

→ La modalité « bio sulfate d'ammonium/AADJ/20 » a donné un rendement s'élevant à 2,42±0,03 gMS/m²/jour.

→ La modalité « conventionnel AAPR » est significativement plus performante que les deux modalités « bio », qui par ailleurs ne présentent pas entre elles un rendement significativement différent.

Observations :

→ Les taux de N-NH₄⁺ ont évolué de manière irrégulière dans les milieux de culture, oscillant entre 8 et 18 mg/L de N-NH₄⁺. Certains bassins tests de spiruline ont vu leur couleur brusquement virer au vert clair/jaune au début du mois d'Août 2017, symptôme d'une dégradation de l'état de santé de la spiruline, et par là même une certaine toxicité de l'ammoniaque vis-à-vis de la spiruline (voir photo ci-contre).



→ Les taux d'oxygène des bassins tests « bio » ont rapidement décliné, symptôme d'un arrêt de l'activité photosynthétique.

(iii) **Méthode d'apport d'azote en dose journalière de 10mg de N-NH₄/L/jour**

Un premier essai mené **en été 2018 (expérimentation N°3)** a permis de poursuivre les travaux engagés sur l'utilisation des intrants ammoniacaux, en revoyant à la baisse la dose d'apport. Les intrants azotés bio (alcali et sulfate d'ammonium) étaient apportés tous les jours dans les milieux « bio » à raison de 10mg de N-NH₄⁺/L/jour en un seul apport. Les modalités d'apports de l'azote par l'alcali et par le sulfate d'ammonium ont été nommées respectivement « modalité bio/alcali/AADJ/10 » (référéncée sous l'appellation « modalité M5b » dans la partie II-5-e) et « modalité bio/sulfate d'ammonium/AADJ/10 » (référéncée sous l'appellation « modalité M6b » dans

la partie II-5-e), tandis que la modalité témoin était menée selon la méthode « conventionnel AADJ/10 » (référéncée sous l'appellation « modalité M2 » dans la partie II-5-e), choix technique qui a été fait dans l'idée d'avoir un mode d'apport de l'azote identique pour chaque modalité, à savoir un apport journalier de 10mg d'équivalent azote/L de milieu de culture/jour.

Rendements :

→ La modalité « conventionnel/AADJ/10 » a donné un rendement s'élevant $2,47 \pm 1,12$ gMS/m²/jour

→ La modalité « bio alcali/AADJ/10 » a donné un rendement s'élevant à $4,58 \pm 1,05$ gMS/m²/jour

→ La modalité « bio sulfate d'ammonium/AADJ/10 » a donné un rendement s'élevant à $3,98 \pm 2,27$ gMS/m²/jour.

→ La modalité « conventionnel AADJ » est significativement moins performante que la modalité « bio alcali/AADJ/10 », tandis que la modalité « bio sulfate d'ammonium/AADJ/10 » présente un écart type trop important pour aboutir à une conclusion fiable sur ses performances comparées avec les autres modalités tests, notamment en raison du dysfonctionnement de l'un des bassins tests. Sans prendre en compte ce bassin défaillant, le rendement est similaire à la modalité « bio alcali/AADJ/10 »

Observations :

→ Les taux de N-NH₄⁺ sont restés stables dans les milieux, variant entre 8 et 11 mg/L de N-NH₄⁺ et les milieux de culture « bio » présentaient un état de santé général plus favorable que lors des essais de 2017, tandis que les observations microscopiques montraient une intégrité satisfaisante des cellules de spiruline, suggérant qu'un apport d'azote ammoniacal de 10 mg/L/jour est plus adéquat qu'un apport de 20 mg/L/jour et permet un rendement satisfaisant, significativement plus élevé dans le cas de l'alcali par rapport à la modalité conventionnel AADJ.

→ L'alcali est en effet un produit très volatile et extrêmement malodorant (rejet d'ammoniac dans l'air lors de l'ouverture du bidon et lors du transport du produit) et induit la nécessité d'utiliser un masque à gaz, sans recul sur l'impact que son utilisation peut avoir sur l'utilisateur. Le sulfate d'ammonium ne présente pas cette problématique et a été jugé comme étant plus satisfaisant que l'alcali pour l'utilisateur (producteur de spiruline).

Un second essai mené **en été 2019 (expérimentation N°4)** avait pour but de valider les résultats obtenus durant l'été 2018, et de comparer cette fois-ci les deux modalités d'apport de l'urée en conventionnel AAPR et AADJ (référéncées sous les appellations « modalité M1 » et « modalité M2 » dans la partie II-5-e) avec la modalité « bio sulfate d'ammonium/10 » (référéncée sous l'appellation « modalité M6b dans la partie II-5-e).

Rendements :

→ Pour rappel, les rendements obtenus pour les modalités témoins urée AAPR et AADJ (présentées en III-1-a) respectivement de $3,04 \pm 0,45$ gMS/m²/jour et de $3,43 \pm 0,02$ gMS/m²/jour, ne présentent pas une différence significative ;

→ La modalité « bio sulfate d'ammonium/10 » présente un rendement de $3,61 \pm 0,33$ gMS/m²/jour, soit un rendement non significativement différent par rapport au témoin AADJ mais légèrement supérieur au témoin AAPR, démontrant que la modalité « bio sulfate d'ammonium » peut être autant voire plus performante que les modalités conventionnelles.

DISCUSSION sur l'utilisation d'azote ammoniacal pour la culture de spiruline :

Les résultats obtenus montrent que la culture « bio » à base de sulfate d'ammonium ou d'alcali est possible, et que les rendements peuvent être identiques voire supérieurs aux modes de culture conventionnelle dès lors que l'apport d'engrais azoté ammoniacal se fait de manière progressive, à des doses d'environ 10 mg de $N-NH_4^+/L$ de milieu de culture/jour, en surveillant par ailleurs régulièrement les concentrations en azote ammoniacal dans le milieu pour qu'elles ne dépassent pas un seuil de sécurité de 15 mg de $N-NH_4^+/L$ (ce qui va dans le sens d'une étude de Bao et al, 2012). Les intrants à base d'azote ammoniacal doivent être par ailleurs régulièrement analysés pour mettre à jour le titrage en ammoniacque, car ce dernier évolue au cours du temps en raison du caractère volatil de ce produit et de même dans des bidons fermés. L'acceptabilité de ces produits par les producteurs reste cependant une source d'interrogation, notamment pour l'alcali, en raison des caractéristiques olfactives du produit et de la nécessité de porter un masque avec des cartouches filtrantes pour éviter tout problème de santé pour l'utilisateur.

Il est intéressant de noter que l'évolution de la forme azote nitrique ($N-NO_3^-$) dans le milieu s'est faite de façon différente selon les doses d'apport 20 et 10 mg/L/jour de $N-NH_4^+$ pour les intrants « bio » :

- ✓ Avec la dose de 20 mg/L/jour de $N-NH_4^+$, le taux de nitrates tendait à augmenter au cours du temps (hausse de 0 à 120 mg/L de $N-NO_3^-$ environ pour les deux intrants testés, alcali et sulfate d'ammonium en l'espace de 4 mois environ) ;
- ✓ Avec la dose 10 mg/L/jour de $N-NH_4^+$ pour la méthode AAPR, le taux de nitrates tendait à évoluer de manière assez aléatoire (entre des valeurs s'échelonnant de 0 à 60 mg/L de $N-NO_3^-$) sans suivre une véritable logique.

Il est intéressant dans les deux cas de constater qu'il y a eu formation de nitrates dans un milieu de culture qui à la base ne contenait pas du tout cette forme azotée, ce qui induit une activité métabolique de transformation de l'azote dans le milieu de culture, d'origine bactérienne probablement. La hausse de nitrates dans le premier cas peut s'expliquer par le fait que l'azote (sous forme ammoniacale) était apporté en excès par rapport aux besoins de la spiruline., tandis que l'évolution plus erratique dans le second cas peut s'expliquer par l'hétérogénéité de la croissance de la spiruline au cours du temps (selon les conditions de température et de lumière), donnant lieu à des cycles de stockage/prélèvement dans cette réserve d'azote nitrique en fonction des besoins de la spiruline. Le fait que ce taux de nitrates puisse baisser par période laisse également supposer que la spiruline a puisé dans cette ressource, et donc que l'azote ammoniacal apporté dans le milieu était parfois insuffisant par rapport aux besoins, notamment lorsque la densité culture était élevée (secchi faible).

Un certain équilibre semble avoir été trouvé avec l'apport d'une dose de 10 mg/L/jour de $N-NH_4^+$. Pour éviter toute carence azotée ou toute accumulation excessive d'ammoniacque, l'idéal serait de pouvoir ajuster la dose apportée en fonction de la densité de culture dans les bassins en établissant une relation linéaire entre une densité de culture (selon la densité optique ou la turbidité par exemple) et les besoins en azote.

d- Source azotée « bio » à base d'azote ammoniacal : effet du mode d'apport

Etant donné le manque de littérature sur le sujet, en parallèle des réflexions menées sur la dose d'apport de l'engrais « bio » à base d'azote ammoniacal s'est posée la question du mode d'apport de cet azote ammoniacal, primordial si l'on souhaite optimiser l'utilisation de l'azote par la spiruline ainsi que le relargage d'azote dans l'environnement.

RÉSULTATS :

(i) Méthode d'apport d'azote en dose journalière de 10mg de N-NH₄/L/jour en apport journalier « unique » VS apport journalier « progressif en goutte à goutte »

L'essai mené en automne 2017 (expérimentation N°2), a permis de tester deux méthodes d'apport journalier de l'intrant « bio » à base d'ammoniacale : une méthode où l'intrant est apporté de manière progressive en goutte à goutte (« GAG ») étalé sur la période la plus ensoleillée de la journée (de 9H à 17H) = modalité « bio alcali/AADJ/10/GAG » (référéncée sous l'appellation « modalité M7 » dans la partie II-5-e) et une autre méthode d'apport où l'intrant est distribuée en une seule fois, en « batch », chaque matin à 9H = modalité « bio alcali/AADJ/10 » (référéncée sous l'appellation « modalité M5b » dans la partie II-5-e).

La dose d'apport choisie était dans les deux cas de 10 mg de N-NH₄⁺/L/jour et l'intrant testé était l'alcali. La modalité témoin était menée selon la méthode « conventionnel AAPR » (référéncée sous l'appellation « modalité M1 » dans la partie II-5-e)

Rendements :

- La modalité « conventionnel AAPR » a donné un rendement s'élevant 3,17±0,21 gMS/m²/jour ;
- La modalité « bio alcali/AADJ/10 » a donné un rendement s'élevant 3,63±0,64 gMS/m²/jour ;
- La modalité « bio alcali/AADJ/10/GAG » a donné un rendement s'élevant 3,29±0,18 gMS/m²/jour

Observations :

- La modalité « bio alcali/AADJ/10 » est légèrement plus performante que les modalités « conventionnel AAPR » et « bio alcali/AADJ/10/GAG », tandis que ces deux dernières ont un rendement comparable.

DISCUSSION sur le mode d'apport de l'azote ammoniacal :

L'apport d'alcali en goutte à goutte n'a pas eu d'impact positif sur les performances de croissance de la spiruline par rapport à un apport unique. Si les différences de rendement observées entre les deux modes d'apport de l'alcali ne sont pas assez importantes pour conclure de la supériorité de l'un ou l'autre, il ne semble en tous cas pas nécessaire de recourir à un système de distribution de l'intrant ammoniacal en goutte à goutte. L'étude a toutefois été réalisée dans des bassins à échelle expérimentale, dotés d'une capacité de brassage importante, de l'ordre de 6000L/h permettant ainsi une dilution rapide de l'azote ammoniacal. Dans le cas de bassins peu agités, il est envisageable que le fait d'apporter une trop forte quantité d'ammoniacale dans une zone localisée puisse aboutir à une mortalité de la spiruline, si le mélange eau/ammoniacale ne se fait pas assez rapidement : dans ce cas de figure, l'apport en goutte à goutte pourrait être une bonne solution.

Une nouvelle fois, il a été montré que la culture « bio » avec un intrant à base d'ammoniacale peut induire un rendement similaire voir plus important qu'en culture « conventionnelle ».

e- Source azotée « bio » à base d'azote organique

RÉSULTATS :

(i) Méthode d'apport d'azote organique selon un équivalent azote similaire au milieu conventionnel

Durant l'été 2017 (expérimentation N°1), un test a été réalisé sur une modalité d'apport d'intrant organique Frayssinet « Bio Frayssinet/AAPR » (référéncée sous l'appellation « modalité M8 » dans la partie II-5-e) correspondant à des concentrations en azote total similaire à ce que l'on peut trouver dans le milieu de culture « conventionnel AAPR » à savoir environ 300 mg/L d'azote au moment de l'ensemencement. Ainsi, les quantités des deux produits apportés au début de l'expérimentation (Nutribio et nutrikali, ratios NPK respectifs de 3-5-4 et 4-0-7) ont été calculées de manière à formuler un milieu de culture s'approchant du milieu conventionnel en termes d'azote et de phosphore, rendu possible par la composition de ces deux engrais. L'ensemble de l'azote et du phosphore apportés étaient d'origine organique. Le taux de potassium a pour sa part été corrigé avec du sulfate de potassium étant donné que la concentration en cet élément était insuffisante par le biais de cette formulation.

Observations :

→ Il a rapidement été noté une importante augmentation de la turbidité du milieu et de sa couleur, et ce en raison de la vinasse de betterave qui fait partie de la formulation de ce produit. Il est en effet devenu marron foncé (voir photo ci-contre), tendance qui ne s'est pas estompée au cours du temps.



→ Il a également été noté une odeur nauséabonde

notamment durant les premières semaines, ainsi qu'une production très importante de boues et de matière organique en suspension dans le milieu ou déposées sur les bords des bassins. Par ailleurs, la mortalité de la spiruline était élevée au regard des observations microscopiques, et le pH tendait à diminuer au cours du temps jusqu'à descendre en dessous de ph 8 ce qui est inadapté à la culture de spiruline). Le taux d'oxygène a rapidement décliné avant de devenir nul, symptôme d'un arrêt de l'activité photosynthétique. En deux mois de tests, le bassin n'a pas permis d'aboutir à une seule récolte malgré un maintien en vie de la souche et une tendance à la croissance vers la fin de l'étude ;

→ Sans même évoquer le rendement quasi nul (mais potentiellement perfectible par un mode d'apport adapté), les facteurs « odeur », « couleur » ont permis de conclure que ce couple d'intrants était inadapté à la production de spiruline commerciale ;

→ Des tests supplémentaires menés de manière prospective, à l'échelle de l'aquarium, ont montré que des apports journaliers de 15 ou de 30 mg d'azote organique/L/jour par le biais des intrants Frayssinet permettait d'avoir une production de spiruline, sans différence significative sur le rendement, et dans les deux cas aboutissant à une teinte progressive du milieu de culture.

→ Suite à ce premier essai infructueux mené avec l'engrais Frayssinet, il a été décidé de tester une modalité d'apport de l'intrant organique basé sur la méthode « AADJ » qui fonctionne pour les intrants à base d'azote ammoniacal, à savoir un apport journalier d'une faible dose de produit en se basant sur un équivalent azote de 10mgN/L/jour.

(ii) **Méthode d'apport d'une dose journalière de 10 mg d'azote organique/L/jour VS
Méthode d'apport conventionnel durée en AAPR**

(i) L'essai mené **en été 2019 (expérimentation N°4)** a permis de tester un nouvel intrant organique, moins concentré en mélasse que l'intrant Frayssinet, à savoir l'Isotonic B (ratio NPK de 3-1-2) de l'entreprise Bio3G. La modalité testée « Bio/Isotonic/AADJ/10 » (*référéncée sous l'appellation « modalité M8 » dans la partie II-5-e*) était basée sur un apport journalier d'un volume de produit permettant correspondant à 10 mgN_{organique}/L/jour. Les quantités de phosphore et de potassium contenues dans le produit sous forme organique (insuffisantes pour subvenir aux besoins de la spiruline selon le référentiel de culture conventionnelle) étaient négligées et apportées intégralement par de l'acide phosphorique et du sulfate de potassium (intrants « bio ») selon les concentrations classiques de P et K pratiquées en culture conventionnelle. Il a été choisi de négliger l'apport de P et de K par le produit Isotonic au cas où le phosphore et le potassium organique seraient non assimilables par la spiruline, et afin que l'azote soit la seule variable nutritionnelle pouvant limiter la croissance de la spiruline.

Rendements :

→ La modalité « Bio/Isotonic/AADJ/10 » a donné un rendement s'élevant 2,02(±0,24) gMS/m²/jour, soit un rendement significativement plus faible par rapport aux autres modalités testées en parallèle dans le cadre de l'expérimentation N°4, à savoir les modalités « conventionnel AAPR » et « conventionnel AADJ/10 », et la modalité « bio sulfate d'ammonium/AADJ/10 » qui pour rappel présentaient respectivement un rendement de 3,04±0,45 gMS/m²/jour, 3,43±0,02 gMS/m²/jour, et 3,61±0,33 gMS/m²/jour.

Observations :

→ Contrairement au test préliminaire mené sur l'intrant Frayssinet, on observe ici un bon comportement de la culture malgré les rendements faibles obtenus ;
→ Le pH de la modalité « Isotonic » était légèrement plus faible que pour les autres modalités, avec un écart de 0,5, écart qui ne s'est pour autant pas creusé avec le temps.

DISCUSSION sur l'utilisation d'azote organique pour la culture de spiruline :

La problématique de la hausse de turbidité qui avait été observée ne s'est pas posés dans le cas de l'intrant Isotonic. Durant les premières semaines de tests, la couleur du milieu tendait à une coloration brune progressive, mais assez rapidement cette couleur a fini par s'estomper. Afin de constater la diminution de cette teinte au cours du temps, un test a été réalisé en laboratoire : des échantillons du milieu « conventionnel » et du milieu « Isotonic » ont été prélevés dans les bassins et ont été filtrés avec une toile de filtration de porosité 20µm pour éliminer la spiruline et ce afin de constater la coloration du milieu après deux mois de culture. En parallèle, une préparation d'isotonic dilué a été réalisée de manière à concentrer l'équivalent de deux mois d'apports de produit en un seul apport afin de simuler la couleur que devrait avoir le milieu de culture s'il n'y avait pas d'abattement de la turbidité.

L'illustration ci-dessous met en évidence que le milieu de culture « organique » présente une teinte assez proche du milieu « conventionnel » et que la turbidité apportée par l'isotonic a disparu, probablement sous l'action de la digestion de la matière organique, que ce soit d'origine bactérienne ou par le biais du métabolisme mixotrophe de la spiruline.



Ainsi, il semble possible de maintenir une culture de spiruline avec un milieu organique sans accumuler de composés responsables d'une hausse incontrôlée de la turbidité du milieu, qui aurait pour résultat une baisse de rendement par un apport lumineux moins efficace.

Le pH du milieu est un paramètre révélateur de la croissance de la spiruline : plus la croissance est élevée, plus l'augmentation de pH est forte. Le pH des milieux de culture de spiruline oscille généralement entre 9,5 (à l'ensemencement) et 10,5 (à la récolte), puis le pH tend à diminuer légèrement lors de l'apport compensatoire de carbone entre deux récoltes (bicarbonate de soude ou CO₂) et à ré-augmenter après une nouvelle phase de croissance. Durant l'essai mené en été 2019, l'intrant organique a induit une légère différence de pH par rapport aux autres modalités tests, -0,5 en moyenne, différence stable au cours du temps. Cependant, lors d'autres tests menés précédemment dans des conditions d'apport identiques de l'intrant Isotonic B, le pH du milieu avait une tendance nette à la diminution au cours du temps, ce qui rejoint le phénomène observé avec l'intrant Frayssinet. Une telle baisse de pH semble trouver son explication dans l'activité bactérienne hétérotrophe qui digère la matière organique présente dans le milieu. Cette tendance mérite d'être étudiée de plus près dans le cadre de futurs tests sur les intrants organiques, car un pH trop faible (<9) est incompatible avec le GBPH pour des raisons d'ordre sanitaire et pourrait ainsi limiter l'utilisation de ce type d'intrant pour la culture biologique.

Des tests « prospectifs » à petite échelle (aquariums) ont montré que le l'apport couplé d'Isotonic B (10mg N_{organique}/L/jour) et de sulfate d'ammonium (10mg N-NH₄⁺/L/jour) aboutissait à un rendement plus faible que pour un apport seul de 10mg N_{organique}/L/jour ou de 10mg N-NH₄⁺/L/jour. Cela s'explique probablement par la transformation de l'azote organique en azote ammoniacal sous l'action de bactéries, et donc une tendance à une accumulation excessive d'azote ammoniacal. Il ne semble donc pas pertinent de coupler ces deux intrants dans le cadre d'une culture biologique ; il serait pas contre intéressant de mesurer l'impact du couplage d'intrants organiques avec des intrants minéraux conventionnels comme le nitrate de potasse et l'urée, afin d'évaluer l'efficacité d'une culture mixotrophe de spiruline par rapport à une culture autotrophe pure. Cela s'éloigne cependant des objectifs de mise en place d'une labellisation biologique pour la spiruline.

f- Source azotée « alternative » à base d'effluents piscicoles (non bio)

RÉSULTATS :

L'essai mené **en été 2019 (expérimentation N°4)** a permis de tester un intrant alternatif pour la production de spiruline, à savoir un effluent d'origine piscicole. La modalité « conventionnel/effluents piscicoles » a donc été créée (*référéncée sous l'appellation « modalité M10» dans la partie II-5-e*), le principe étant d'appliquer un protocole similaire à la modalité « conventionnel AAPR » avec toutefois une variante sur le mode d'apport de l'azote et sur la source d'eau de renouvellement venant compenser l'évaporation hebdomadaire des bassins de culture : aucun apport d'urée n'a été effectué

que ce soit à l'ensemencement ou en cours de culture, tandis que l'eau utilisée pour compenser l'évaporation ne venait pas du réseau « potable » mais de l'eau de surverse en provenance d'un élevage piscicole.

Rendements :

→ La modalité « conventionnel/effluents piscicoles » a donné un rendement s'élevant 3,35±0,12 gMS/m²/jour. Par rapport aux autres modalités testées durant la même expérimentation, cette modalité a été significativement plus performante que la modalité « Bio/Isotonic/AADJ/10 » (2,02±0,24 gMS/m²/jour) légèrement plus performante que la modalité « Conventionnel/AAPR » (3,04±0,45 gMS/m²/jour), légèrement moins performante que la modalité « bio/sulfate d'ammonium/AADJ/10 » (3,61±0,33 gMS/m²/jour), et aussi performante que la modalité « conventionnel/AADJ/10 (3,43±0,02 gMS/m²/jour).

Observations :

DISCUSSIONS sur l'utilisation d'effluents piscicoles pour la culture de spiruline :

La quantité d'azote apporté dans les bassins de culture de spiruline était tributaire 1) du volume d'eau apporté (dépendant de la chaleur dans la serre et donc de l'évaporation des milieux de culture) et 2) de la concentration en azote nitrique dans les effluents piscicoles (variables au cours du temps).

Volume apporté sur la période (L)			[N-NO ₃] effluent aquaponique (mgN/L), moyenne sur la période	Azote nitrique total apporté par les effluents sur la période (mg)		
B2	B5	B12		B2	B5	B12
201	186	231	19,93	3703,04	3703,04	4441,28
618				11847,36		

Les trois bassins de culture test ont reçu au total 12,15 g d'azote nitrique par le biais des effluents piscicoles. Si l'on compare cela aux 123g apportés par le nitrate de potasse. Sur les 73 jours de l'étude, l'apport d'azote nitrique apporté par les effluents piscicoles ne représentait au final que 10% de l'azote total apporté dans les bassins de culture, le reste (90%) ayant été apporté par le nitrate de potasse dans le milieu de culture initial précédant l'ensemencement en spiruline.

Rapporté en termes d'apport d'azote total journalier, les bassins de culture ont reçu l'équivalent de 0,360mg N/L/jour sur la période expérimentale par le biais des effluents piscicoles exclusivement, à comparer aux 10mg N/L/jour appliqués pour les modalités « bio » avec de l'azote ammoniacal.

Le taux de protéine dans la spiruline a été étudié afin d'évaluer la quantité d'azote présente dans le produit fini et par la même la quantité d'azote fixée par la spiruline au cours de l'étude. Selon la FAO, le taux de conversion entre les protéines et l'azote contenu varie entre 5,26 et 7,69. La valeur de 6,25 est communément utilisée (FAO, 2002). Ainsi, la quantité d'azote contenue dans les protéines est en général calculés de cette manière : $Quantité\ d'azote\ (g/100g) = \frac{Quantité\ de\ protéines\ brutes\ (g/100g)}{6,25}$. Le taux de protéines brutes de la spiruline cultivée selon cette modalité « conventionnel/effluents piscicoles » étant de 63,1% sous sa forme séchée, on peut estimer qu'elle contenait 10,1 g d'azote/100g de MS (en considérant que les protéines contiennent 16% d'azote en moyenne). Ainsi, les 844g de spiruline produite représentaient un équivalent azote de 85,24g.

Cela permet de raisonner les calculs permettant d'aboutir à la quantité d'azote extraite par la spiruline : au total, la spiruline a fixé 63% de l'azote total apporté tout au long de la culture (apport de nitrate de potasse initial + apports d'azote nitrique par les effluents piscicoles). Cependant, sans le nitrate de potasse apporté à l'ensemencement, l'azote nitrique apporté par les effluents piscicoles

n'aurait pas suffi pour subvenir aux besoins de la spiruline comme évoqué plus haut. Il serait donc intéressant d'évaluer les conditions qui auraient été propices pour que les effluents piscicoles soient une source d'azote se suffisant à elle seule pour satisfaire les besoins de la spiruline dans nos conditions de culture, en gardant un volume d'apport identique mais en jouant sur la concentration de l'effluent en azote nitrique : en effet, la limite de ce système est le besoin de renouvellement en eau qui ne peut pas excéder la quantité d'eau évaporée.

L'eau qui a été prélevée pour compenser l'évaporation dans les bassins de culture de spiruline provenait de la surverse d'un compartiment de phytoépuration (aquaponie), et présentait en moyenne une concentration de 19,93 mg/L de $N-NO_3^-$ (arrondissons à 20 mg/L). Or, l'azote avait déjà été épuré par le compartiment végétale, aboutissant à un taux de nitrates relativement faible. Il serait donc plus pertinent de prélever de l'eau directement en sortie d'un circuit recirculé de pisciculture si l'on souhaite co-produire de la spiruline avec des effluents d'élevage plus concentrés.

Pour que le volume d'eau apporté aux cultures de spiruline soit suffisant pour apporter l'azote nécessaire pour obtenir un rendement adéquat, il aurait fallu que les effluents piscicoles soient environ sept fois plus concentrés, c'est-à-dire autour de 140 mg/L de $N-NO_3^-$: cet objectif de concentration est tout à fait atteignable dans un système recirculé fermé commercial, et a déjà été atteint sur le pilote d'aquaponie du RATHO, avec une densité d'élevage maximale et un taux d'ouverture minimal du système. Dans le cas de figure où l'on aurait une eau chargée à 140 mg/L de $N-NO_3^-$, l'apport d'azote journalier aurait été de 2,52mg $N-NO_3^-$ /L/jour, contre 10 mg $N-NH_4^+$ /L/jour pour la culture biologique menée avec des intrants ammoniacaux ; et ce pour des résultats à priori similaires.

Sur la période d'étude, le niveau d'évaporation a été de l'ordre de 2,42L d'eau /m² de culture/ jour. Ainsi, si l'on se réfère au volume d'effluent que rejette le pilote de circuit piscicole recirculé du RATHO lorsqu'il est à 100% de sa capacité de charge piscicole (1800L par jour), et en considérant une concentration optimale en azote dans ces effluents, il faudrait envisager une surface de production de spiruline de 750 m² environ pour épurer l'ensemble de l'azote rejeté par le circuit piscicole.

Cette étude a l'intérêt d'apporter des données chiffrées sur la capacité phytoépuration de la spiruline et sur les possibilités de coupler élevage piscicole et culture de spiruline afin d'améliorer le bilan environnemental des deux productions selon une démarche d'économie circulaire : elle permet de conclure qu'une surface de 1100m² de culture de spiruline pourrait théoriquement permettre d'épurer les rejets journaliers d'environ une tonne de poissons d'élevage en charge nourris avec un aliment présentant 40% de protéines selon un taux de rationnement moyen de 1,4%, tout en assurant un rendement en spiruline proche de ceux obtenus dans le cadre de cette étude soit 3,35±0,12 gMS/m²/jour.

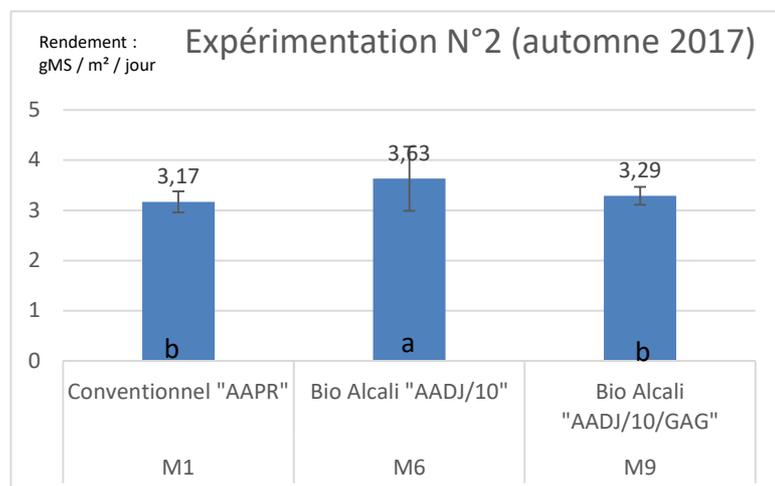
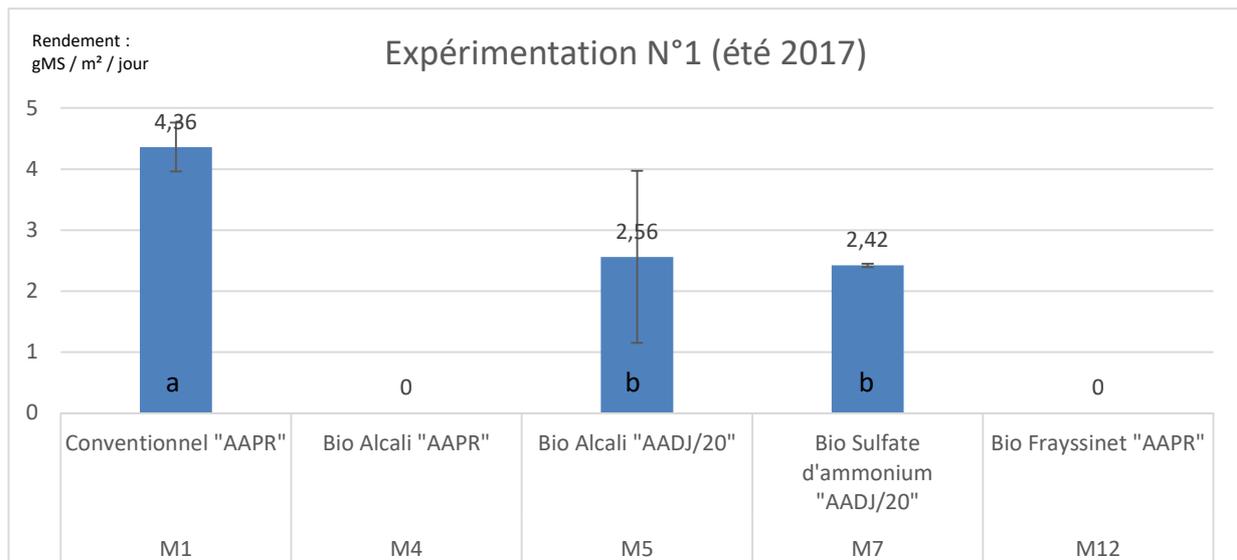
Dans le cas de figure de cette étude, et avec les rendements relativement faibles qui ont été observés, les effluents piscicoles pourraient assurer 100% des besoins de la spiruline en azote sur la période estivale. En raisonnant sur un rendement optimisé de 8g/m²/jour - maximum atteint par la plupart des producteurs français d'après la FSF (2015) - il est possible d'affirmer que les effluents piscicoles d'un circuit recirculé seraient capables d'assurer 40% des besoins azotés de la spiruline tout en évitant ces rejets dans le milieu aquatique. Certains circuits recirculés (notamment en élevage d'espèce robustes comme le tilapia) peuvent être davantage « fermés » et ainsi rejeter des effluents beaucoup plus chargés en azote (jusqu'à 500mg/L d'équivalent azote), ce qui permettrait de diminuer le ratio volume d'élevage piscicole/surface de production. Cependant, d'une espèce de poissons à une autre, les rejets peuvent être très différents et les modèles prédictifs de rejets, assez fiables disponibles aujourd'hui, existent surtout pour la truite arc en ciel.

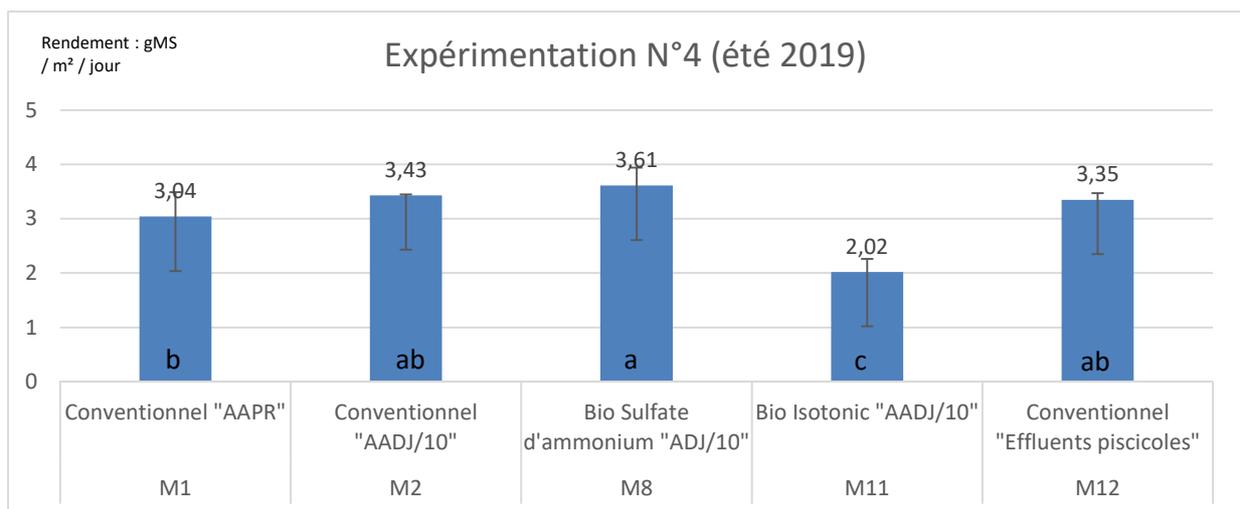
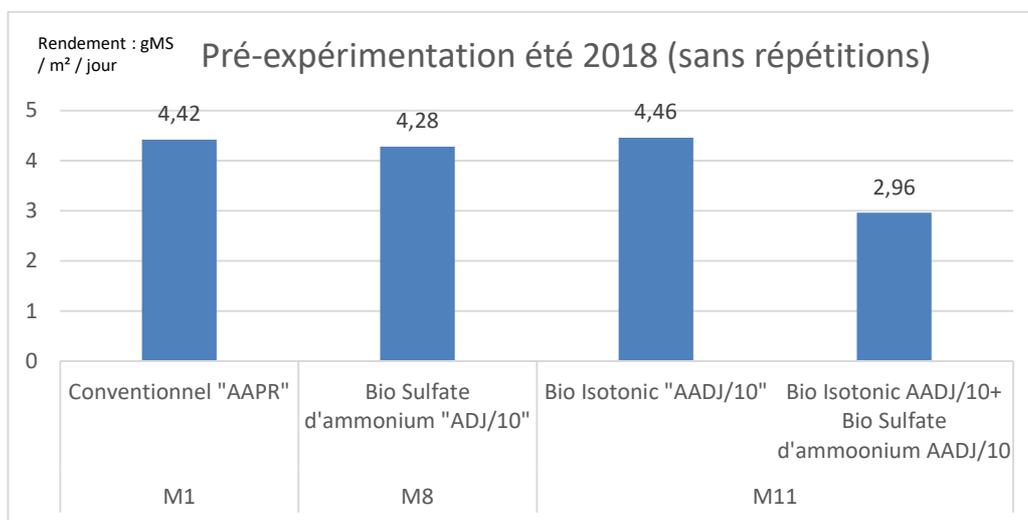
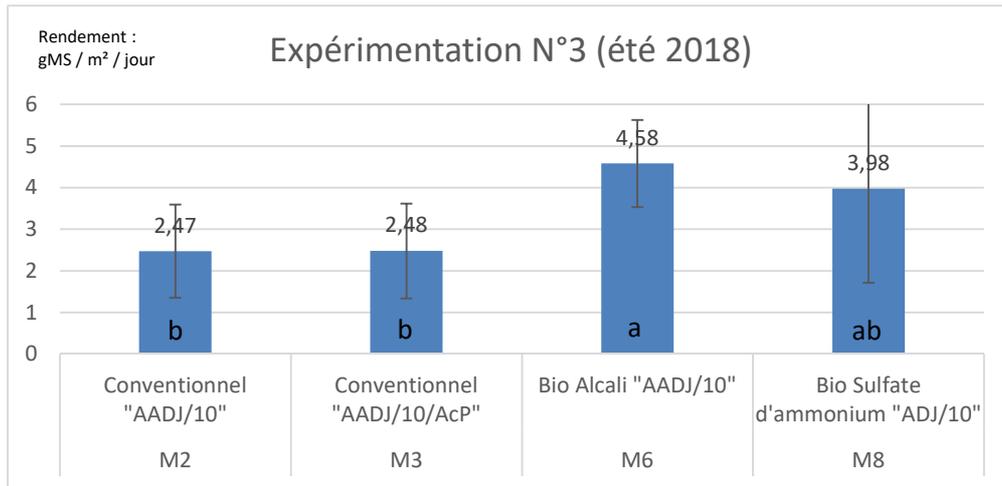
g- Récapitulatif des rendements obtenus pour chaque modalité testée

Note de compréhension de l'indice de significativité : une lettre identique (a b ou c) entre plusieurs modalités indique un niveau de rendement « significativement similaire » ; une différence de lettre entre plusieurs modalités indique un niveau de rendement « significativement différent » ; lorsque qu'une suite de deux lettres est indiquée, cela signifie que la modalité considérée présente un rendement « significativement similaire » à celui de deux autres modalités qui ont elles même un niveau de rendement « significativement différent ».

Il est à retenir toutefois que les statistiques effectuées ne sont pas « robustes » dans le sens où les modalités n'ont été répétées que trois fois et que le nombre d'échantillons est trop faible pour effectuer des tests statistiques « paramétriques » : les résultats indiqués sont donc des « tendances » qui ont pour but de donner des orientations sur les pistes de travail à privilégier.

La pré-expérimentation de l'été 2018 est également présentée dans cette partie, mais l'absence de répétitions pour cette expérimentation « exploratoire » implique l'impossibilité de conclure à de quelconques tendances, en dépit des résultats encourageants obtenus sur la modalité organique « Bio Isotonic AADJ/10 » et des mauvais résultats obtenus sur la modalité mixte « bio Isotonic AADJ/10 » et « bio sulfate d'ammonium AADJ/10 »





h- Conclusion

Si le raisonnement habituel « milieu de culture de base / compensations post récoltes » - utilisé en culture conventionnelle - fonctionne pour la plupart des intrants / nutriments « bio » phosphatés ou potassiques, il s'est avéré nécessaire de raisonner autrement spécifiquement pour les intrants azotés. Ces derniers étant sous forme ammoniacale ou organique - ne peuvent pas être apportés à des teneurs très élevées pour des raisons liées au métabolisme de la spiruline vis-à-vis de certaines formes de l'azote : il est donc nécessaire de les apporter de manière fractionnée (méthode AADJ).

→ L'azote ammoniacal - bien qu'étant la forme azotée la plus assimilable pour les cyanobactéries - peut rapidement devenir toxique pour la spiruline au fur et à mesure de la hausse du pH : en effet, c'est la forme gazeuse NH_3 qui est délétère pour cette cyanobactérie - par diffusion de ce gaz par la membrane des cellules et inhibition de la photosynthèse (Belkin et Boussiba, 1991) ; or plus le pH augmente, plus la prédominance de la forme gazeuse sur l'azote ammoniacal total est forte. Il s'est donc avéré nécessaire de recourir à des apports fractionnés d'une faible dose d'azote ammoniacal. Cette dose pourrait être optimisée en ayant connaissance de la dynamique d'absorption de l'azote ammoniacal sur une journée, et ce en fonction de multiples paramètres (pH, température, luminosité, densité de culture...) mais cela nécessite de lourds travaux de recherche en laboratoire. L'approche d'apport journalier d'une dose « constante de 10 mg d'azote ammoniacal/L/jour s'étant avéré adéquate pour avoir un rendement similaire à ce que l'on peut obtenir en culture conventionnelle, il semble pertinent pour les producteurs de partir sur cette base de connaissance qui semble limiter les risques de mortalité tout en assurant un rendement comparable à celui de la culture conventionnelle.

→ Concernant l'azote organique, un apport fractionné permet d'éviter une hausse trop rapide de turbidité du milieu (et donc une capacité de pénétration de la lumière dans le milieu fortement diminuée) et un relargage trop important d'azote ammoniacal suite à une phase de dégradation de la matière organique. Les doses d'apport testées correspondaient aux doses apportées en milieu bio/azote ammoniacal soit 10 mgN- NH_4^+ /L/jour. Il est d'ores et déjà intéressant de noter qu'il a été possible de faire pousser de la spiruline en milieu organique, mettant en évidence une capacité de la spiruline à utiliser ce type d'intrants (métabolisme hétérotrophe), ou tout du moins à utiliser les rejets métaboliques d'une potentielle flore hétérotrophe accompagnatrice : les rendements restent toutefois moins élevés d'après les tests effectués en été 2019, ce qui reste à valider par d'autres essais sur d'autres intrants formulés avec des matières premières différentes. Il ne semble pas impossible que *A. platensis* puisse s'adapter à ce régime organique au cours du temps et devenir plus performante sur le long terme et/ou qu'une flore bactérienne spécifique soit impliquée et capable d'améliorer la minéralisation de la matière organique aboutissant à des rendements plus élevés pour ce mode de culture. Il serait également intéressant de voir en quelle mesure un apport d'intrants organiques dans les milieux conventionnels pourrait avoir un impact positif dû au fait que l'on stimulerait ainsi le métabolisme hétérotrophe de la spiruline en complément du processus autotrophe qui est le seul exploité à ce jour pour cette cyanobactérie.

Les rendements obtenus dans le cadre de ces essais, en moyenne entre 2,5 et 5 de spiruline par m^2 par jour (MS) toutes modalités confondues, étaient globalement dans la gamme basse des rendements qu'il est possible d'atteindre en culture de spiruline, d'après la littérature : entre 5 et 10 gMS/ m^2 /jour selon Fox (1999), entre 3,5 et 8 gMS/ m^2 /jour d'après l'ADEME (2015) et entre 10 et 12 gMS/ m^2 /jour selon la FAO (2011). Ces modestes performances peuvent être attribuées à une trop faible luminosité dans la serre du RATHO en raison du matériau composant la serre (verre double paroi) qui implique une forte rétention de lumière (50% de la lumière entrante), et également en raison du pouvoir occultant de la toile d'ombrage (40% de la lumière diffusée dans la serre par les vitres) qui s'active selon une consigne afin d'éviter les surcharges lumineuses : les deux éléments combinés

aboutissant la plupart du temps à une côté mal taillée plutôt qu'un équilibre idéal en terme de luminosité.

Outre le paramètre « rendement », il est primordial d'étudier l'impact des intrants alternatifs sur la qualité de la spiruline en termes nutritionnel, microbiologique et sanitaire : la recherche de solutions alternatives aux intrants conventionnels doit en effet aboutir à une solution viable à tout niveau. L'impact économique lié au changement d'intrants doit également être pris en compte.

3- Qualité des produits obtenus en culture biologique

Pour compléter l'approche de faisabilité de la culture de spiruline biologique, des mesures de qualité (nutritionnelle, microbiologique, sanitaire...) ont été réalisées. Pour chaque modalité considérée, les analyses ont été effectuées sur un échantillon composé d'un batch de trois répétitions par modalité.

a- Qualité nutritionnelle : bilan des données obtenues

Le tableau ci-dessous présente des données issues de la littérature portant sur différents paramètres nutritionnels d'intérêt : phycocyanines C, phycocyanines brutes, protéines, fer, bêta carotène (provitamine A), avec les minimum et maximum atteints pour chaque paramètre.

Paramètre recherché	Unités	min	max	
C-Phycocyanine	mg/100g	5000	15000	Boussiba et Richmond 1979, Holman et Malau-Aduli 2013, Niu et al. 2007, Sarada, Pillai, et Ravishankar 1999, USP 2015
Phycocyanines brutes	mg/100g	9400	28200	
Protéines	g/100g	50	70	Falquet et Hurni, 2006, Gershwin et Belay 2008, Holman et Malau-Aduli 2013, USP 2015
Fer	mg/100g	55	600**	Falquet et Hurni, 2006 (** valeur atteignable avec enrichissement spécifique)
Bêta carotène	mg/100g	140	170	Gershwin et Belay 2008, Holman et Malau-Aduli 2013

A noter pour le fer que les spirulines à l'état naturel dépassent rarement des taux de 180 mg/100g. Des taux bien supérieurs peuvent cependant être atteints en enrichissant le milieu en conséquence.

→ Les analyses ont été réalisées par le laboratoire AQMC. Les incertitudes de mesure étaient de l'ordre de 5% pour la phycocyanine, de 3% pour les protéines, de 10% pour le fer, et de 25% pour le bêta carotène.

RÉSULTATS :

Expérimentation N°3 : été 2018

De premières analyses ont été réalisées durant l'été 2018 afin d'obtenir des premières données sur la qualité nutritionnelle de la spiruline « biologique » produite avec des intrants ammoniacaux (alcali et sulfate d'ammonium). Un témoin conventionnel AADJ/10 a également été analysé en parallèle, ainsi qu'une autre modalité test sur l'intrant organique « Isotonic ».

2018 (sur spiruline sèche)		Conventionnel AADJ/10	Bio Alcali AADJ/10	Bio Sulfate d'ammonium AADJ/10	Bio Isotonic AADJ/10
Numéro de modalité		M2	M6	M8	M11
Paramètre recherché	Unités	Résultats			
C-Phycocyanine	mg/100g	11013 (±550)	12145 (±607)	12679 (±633)	11416 (±571)
Phycocyanines brutes	mg/100g	20149 (±1007)	22221 (±1111)	23197 (±1159)	20886 (±1044)
Protéines	g/100g	61,8 (±1,85)	58,5 (±1,75)	63 (±1,89)	64,7 (±1,94)
Fer	mg/100g	58,4 (±5,84)	57,4 (±5,74)	43,2 (±4,23)	54,5 (±5,45)
Béta carotène	mg/100g	128 (±32)	103 (±25,75)	141 (±35,25)	121 (±30,25)

→ Sur cet essai, la spiruline produite avec les intrants à base d'ammoniaque (alcali et sulfate d'ammonium) était globalement plus riche en phycocyanine (>12g/100g) que celle produite avec les intrants conventionnel et organique (<12g/100g). La modalité « bio-alcali » présentait cependant un taux de protéines plus faible que les autres modalités (<60%), tandis que la modalité « bio-isotonic » était la plus riche en protéines (>64%). Concernant le fer, l'ensemble des modalités présentant des taux situés dans la fourchette très basse des normes attendues, avec le taux le plus bas observé pour la modalité « sulfate d'ammonium ». Concernant le taux de béta carotène (provitamine A), la modalité « alcali » présente un taux plus faible que les autres modalités.

Expérimentation N°4 : été 2019

D'autres analyses ont été réalisées durant l'été 2019 afin d'obtenir d'autres données sur la qualité nutritionnelle de la spiruline « biologique » produite avec des intrants ammoniacaux (sulfate d'ammonium). Deux témoins « conventionnel AAPR » et « AADJ 10 » ont également été analysés en parallèle, ainsi qu'une autre modalité test sur l'intrant organique « Isotonic », et une autre modalité test portant sur l'utilisation des effluents piscicoles en tant que source d'azote.

2019 (sur spiruline sèche)		Conventionnel AAPR	Conventionnel AADJ 10	Bio Sulfate d'ammonium AADJ/10	Bio Isotonic AADJ/10	Conventionnel /Effluents piscicoles
Numéro de modalité		M1	M2	M8	M11	M12
Paramètre recherché	Unités	Résultats				
C-Phycocyanine	mg/100g	12947 (±647)	12245 (±612)	10178 (±508,9)	13020 (±651)	10963 (±548)
Phycocyanines brutes	mg/100g	24447 (±1222)	22922 (±1146)	19229 (±961)	24484 (±1224)	20623 (±1031)
Protéines	g/100g	63,9 (±1,92)	66 (±1,98)	58,5 (±1,75)	67,8 (±2,03)	63,1 (±1,89)
Fer	mg/100g	61 (±6,10)	53,9 (±5,39)	46,3 (±4,63)	54,8 (±5,48)	55,9 (±5,59)

→ Sur cet essai, la spiruline produite avec les intrants conventionnels et organiques était cette fois ci plus riche en phycocyanine (>12%) que celle produite avec des intrants à base d'ammoniaque (sulfate d'ammonium) (<11%). La spiruline produite avec les effluents piscicoles présentait également un taux de phycocyanine plus faible (<11%). La modalité « bio-sulfate d'ammonium » présentait également un taux de protéines (<60%) plus faible que les autres modalités. La modalité « bio isotonic » présentait une nouvelle fois un taux de protéines élevé par rapport aux autres modalités. La modalité « conventionnel/effluents piscicoles » contenait un taux de protéines similaire à la modalité « conventionnel AAPR ». Concernant le fer, l'ensemble des modalités présentant des taux situés dans la fourchette très basse des normes attendues, avec le taux le plus bas observé une nouvelle fois pour

la modalité « sulfate d'ammonium ». Peu de différences significatives ne sont à noter entre les deux modalités « conventionnel AAPR » et « AADJ10 » sur l'ensemble des paramètres, tandis que la modalité sulfate d'ammonium était globalement la moins performante des modalités en termes de paramètres nutritionnels, dans le cadre de cet essai.

DISCUSSIONS :

Les résultats obtenus en terme de taux de phycocyanine étaient globalement satisfaisants au regard des valeurs les plus faibles obtenues pour la spiruline d'après la littérature. Aucune conclusion claire ne peut être tirée des résultats en terme de comparaisons entre modalités, la modalité « sulfate d'ammonium » étant la plus performante pour ce paramètre dans l'essai de 2018, et la moins performante dans le cadre de l'essai 2019.

En terme de taux de protéines, les valeurs obtenues se situaient également dans les normes (entre 50 et 70% de protéines et plus globalement systématiquement au-dessus de 58%). La modalité « bio Isotonic » semble impliquer dans les deux expérimentations un meilleur taux de protéines, ouvrant une piste d'étude intéressante sur l'enrichissement des milieux de culture en matière organique et son potentiel pour améliorer le taux de protéines dans le produit fini, sans pour autant que l'intrant organique ne devienne la source principale d'azote étant donné les résultats de rendement apparemment plus faibles et étant donné le prix de cet intrant.

Les résultats obtenus en terme de taux de fer sont globalement faibles toute modalités confondues, ce qui met en évidence une problématique liée à la concentration en fer dans les milieux de culture et/ou à l'assimilation de la forme de fer ajoutée (sulfate de fer chélaté à l'acide citrique). Ces résultats pourraient être améliorés en utilisant des formes de fer chélaté DTPA ou EDDHA. Une meilleure assimilation du fer pourrait impliquer une stimulation de la photosynthèse et par là même de meilleurs résultats de croissance de la spiruline. Les taux encore plus faibles observés pour la modalité « sulfate d'ammonium » dans les deux essais laissent supposer une potentielle interaction négative entre le sulfate de fer et le sulfate d'ammonium dans les milieux de culture. Les résultats obtenus en terme de taux protéines sont également difficilement interprétables, chaque modalité étant plus ou moins performante selon l'année de l'essai. Les valeurs obtenues, toute modalités confondues, sont toutefois conformes aux normes attendues d'après les intervalles de valeurs indiquées dans la littérature.

Ces données ne sont pas à prendre comme références, elles n'ont que pour rôle d'enrichir les bases de données nutritionnelles et d'apporter de premiers éléments informatifs. Il serait nécessaire de multiplier les analyses sur un panel plus vaste de production « bio » dans différents contextes de production afin d'avoir des valeurs plus représentatives de la réalité.

b- Qualité microbiologique: bilan des données obtenues

Contexte réglementaire : <https://agriculture.gouv.fr/denrees-alimentaires-criteres-microbiologiques-dhygiene-des-procedes>

Les dispositions réglementaires du Paquet Hygiène imposent aux opérateurs du secteur alimentaire l'obligation de mettre en place, sous leur responsabilité, un plan de maîtrise sanitaire (PMS), qui prend en compte les bonnes pratiques d'hygiène et les procédures fondées sur l'HACCP. Il s'agit en particulier, pour les professionnels, de réaliser une analyse des dangers et de définir les moyens mis en œuvre de façon préventive pour garantir la maîtrise des dangers identifiés. Un plan d'autocontrôles doit être intégré dans le PMS, incluant des analyses microbiologiques destinées à valider, surveiller et vérifier l'efficacité du dispositif préventif de maîtrise mis en place dans chaque établissement.

Notons qu'il existe 2 types de critères microbiologiques :

- Les critères **de sécurité** : définis dans le RCE n°2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. Cela concerne *Listeria monocytogènes* pour les produits prêts à être consommés et *Salmonella* pour les viandes hachées et les préparations de viande (ex : merguez) et les produits à base de viandes à consommer crus. Ces critères sont obligatoires. Un produit qui ne les respecte pas est jugé dangereux pour la santé du consommateur.
- Les critères **d'hygiène des procédés** : qui sont téléchargeables sur le site de la DGAI : <http://agriculture.gouv.fr/sections/thematiques/alimentation/securite-sanitaire/criteres> et qui sont des critères indicateurs du respect des bonnes pratiques d'hygiène. Certains critères d'hygiène des procédés sont définis de façon réglementaire pour différentes catégories de produits (cf. chapitre 2 annexe I du règlement (CE) n°2073/2005). D'autres sont établis par les professionnels, sur la base de l'analyse des dangers, secteur par secteur, et seront à terme inclus dans les Guides de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP (GBPH).

Contexte filière :

La Fédération des Spiruliniers de France travaille actuellement à la rédaction d'un "Guide des Bonnes Pratiques d'Hygiène" (GBPH) afin de normaliser les méthodes de production et offrir aux consommateurs les meilleures garanties sanitaires des spirulines produites en France et en Europe. Ainsi les opérations de séchage sont réalisées dans un pas de temps le plus court possible et à basse température (<40°C) afin de mieux préserver les qualités nutritionnelles du produit. La qualité du séchage qui doit aboutir à moins de 9 % d'eau pour limiter la survie des microorganismes. Les tableaux ci-dessous présentent des données microbiologiques obtenues sur la spiruline produite dans le cadre des essais expérimentaux. Les critères recherchés portent sur différents indicateurs classiquement recherchés sur les denrées alimentaires :

- Microorganismes aérobies mésophiles à 30°C ;
- Coliformes thermo-tolérants à 44°C ;
- Anaérobies sulfite-réducteurs à 46°C ;
- *Clostridium perfringens* ;
- Staphylocoques à coagulase positive ;
- Salmonelles ;
- *Listeria monocytogènes*.

→ Les critères de qualité à respecter ont été définis par la filière dans le cadre du développement d'un GBPH (avis CSHPF, règlement CE N°2073/2005 modifié, plus critères proposés par la FSF).

RÉSULTATS :

Expérimentation N°2 : automne 2017, analyses sur spiruline fraîche

De premières analyses ont été réalisées durant l'automne 2017 afin d'obtenir des données sur la qualité sanitaire de la spiruline « fraîche », selon la modalité conventionnelle ou biologique. Les prélèvements ont été réalisés avec des gants stériles et les échantillons ont été conditionnés dans des sachets stériles pour limiter les contaminations extérieures au moment du prélèvement, avant envoi au laboratoire d'analyses AQMC. Pour autant, l'environnement de culture (milieu de culture) et de récolte (toiles de filtration, presse mécanique, instruments utilisés pour la manipulation de la spiruline) n'étaient pas stériles pour se mettre en conditions réelles de production.

Au moment du prélèvement (03/11/2017), la température de l'eau dans les bassins était de 20°C en moyenne et le pH oscillait entre 10 et 10,5 selon les modalités. L'envoi a été réalisé en Chronopost et les analyses ont été réalisées à J+36H (température de réception 5,8°C).

2017 (sur spiruline fraîche)			Conventionnel AAPR	Bio Alcali AADJ/10	Bio Alcali AADJ/10/GAG
Numéro de modalité			M1	M6	M9
Paramètre recherché	Unités	Critères	Résultats		
Micro organismes aérobies 30°C	UFC/g	<100000	38000	36000	17000
Coliformes thermotolérants 44°C	UFC/g	<100	<10	<10	<10
Anaérobie sulfite réducteurs 46°C	UFC/g	<100	<10	<10	<10
Clostridium perfringens	UFC/g	<10	<5	<5	<5
Staphylocoques à coagulase positive	UFC/g	<100	<100	<100	<100
Salmonella	/25g	Absence	Non détecté	ND	ND
Listeria monocytogènes	UFC/g	<100	<10	<10	<10

→ L'ensemble des critères de qualité sanitaire ont été respectés sur les trois modalités tests.

Expérimentation N°3 : été 2018

Une autre campagne d'analyse a été réalisée durant l'été 2018 afin d'obtenir des données sur la qualité sanitaire de la spiruline « sèche », selon la modalité conventionnelle ou biologique. Les manipulations de la spiruline post filtration/presse étaient réalisées avec des gants stériles. Pour autant, l'environnement de culture (milieu de culture), de récolte (toiles de filtration, presse mécanique, instruments utilisés pour la manipulation de la spiruline), d'extrusion (pistolet Sika) et de séchage (toile de séchage, déshydrateur) n'étaient pas stériles, pour se mettre en conditions réelles de production. La spiruline fraîche (extrudée sous forme de spaghettis) était séchée à une température de 40°C pendant 8H dans un déshydrateur, et les paillettes ainsi obtenues étaient conditionnées dans des sachets stériles pour envoi au laboratoire d'analyse AQMC.

Au moment du prélèvement (21/07/2018), la température de l'eau dans les bassins était de 27°C en moyenne et le pH oscillait entre 9,8 et 10,1 selon les modalités. L'envoi a été effectué en colis classique sans mise au frais, le produit étant sec et donc stabilisé.

2018 (sur spiruline sèche)			Conventionnel AADJ/10	Bio Alcali AADJ/10	Bio Sulfate d'ammonium AADJ/10	Bio Isotonic AADJ/10
Numéro de modalité			M2	M6	M8	M11
Paramètre recherché	Unités	Critères	Résultats			
Micro organismes aérobies 30°C	UFC/g	<100000	3000	12000	3000	5000
Coliformes thermotolérants 44°C	UFC/g	<100	180	<10	200	<10
Anaérobie sulfite réducteurs 46°C	UFC/g	<100	<10	<10	<10	<10
Clostridium perfringens	UFC/g	<10	<5	<5	<5	<5
Staphylocoques à coagulase positive	UFC/g	<100	<100	<100	<100	<100
Salmonella	/25g	Absence	Non détecté	Non détecté	Non détecté	Non détecté
Listeria monocytogènes	UFC/g	<100	<10	<10	<10	<10

→ L'ensemble des critères de qualité sanitaire ont été respectés sur les quatre modalités tests, à part sur le critère « coliformes thermo-tolérants ». Il a en effet été noté un léger dépassement des normes applicables à ce critère d'hygiène pour les modalités « conventionnel AADJ/10 » et « bio/sulfate d'ammonium AADJ/10 ».

Expérimentation N°4 : été 2019

Une troisième campagne d'analyse a été réalisée sur la spiruline sèche de différentes modalités conventionnelle et biologiques durant l'été 2019, dans des conditions de manipulation, récolte, extrusion, séchage... comparables avec le protocole suivi durant l'été 2019.

Au moment du prélèvement (28/06/2019), la température de l'eau dans les bassins était de 25°C en moyenne et le pH oscillait entre 9,8 et 10,2 selon les modalités. L'envoi a été effectué en colis classique sans mise au frais, le produit étant sec et donc stabilisé.

2019 (sur spiruline sèche)			Conventionnel AAPR	Conventionnel AADJ 10	Bio Sulfate d'ammonium AADJ/10	Bio Isotonic AADJ/10	Conventionnel / Effluents piscicoles
Numéro de modalité			M1	M2	M8	M11	M12
Paramètre recherché	Unités	Critères	Résultats				
Micro organismes aérobies 30°C	UFC/g	<100000	150000	100000	68000	220000	63000
Coliformes thermotolérants 44°C	UFC/g	<100	<10	<10	<10	<10	<10
Anaérobies sulfite réducteurs 46°C	UFC/g	<100	<10	<10	<10	<10	<10
Clostridium perfringens	UFC/g	<10	<5	<5	<5	<5	<5
Staphylocoques à coagulase positive	UFC/g	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Salmonella	/25g	Absence	Non détecté	Non détecté	Non détecté	Non détecté	Non détecté
Listeria monocytogènes	UFC/g	<100	<10	<10	<10	<10	<10

des normes applicables à ce critère d'hygiène pour les modalités « conventionnel AAPR » et « bio isotonic AADJ/10 ».

DISCUSSIONS :

Tout comme pour les données nutritionnelles, ces résultats constituent de premiers éléments informatifs mais ne reflètent en aucun cas une vérité générale. Il serait nécessaire de multiplier les analyses sur un panel plus vaste de production « bio » dans différents contextes de production afin d'avoir des valeurs plus représentatives de la réalité. Les dépassements de normes observés sur certains critères d'hygiène sont « acceptables » et sont le symptôme d'un haut niveau d'exigence sanitaire visé par la filière.

Notons toutefois que le fait que certaines modalités de culture soient plus contaminées que d'autres ne provient pas forcément de la nature de l'intrant (conventionnel ou biologique, minéral ou organique) car il n'est observé aucune répétabilité entre l'été 2018 et l'été 2019 pour des conditions de prélèvement similaires.

L'on pourrait s'attendre à une quantité très importante de contaminants dans les modalités « Bio Isotonic » et « conventionnel/effluents piscicoles », de par la nature organique du premier et de par l'origine « piscicole » du second : cela n'a pourtant pas été le cas, ce qui montre que la phase de séchage du produit est primordiale pour limiter la présence de microorganismes indésirables. Il serait intéressant de voir l'impact de ces modalités sur la microbiologie de la spiruline sèche.

Des travaux doivent être poursuivis pour étudier l'impact de certaines pratiques de culture sur les paramètres microbiologiques du produit final sur spiruline fraîche ou sèche (conventionnelle ou biologique): mode de brassage du milieu de culture, rinçage ou non de la masse de spiruline lors de la filtration, écumage ou non.

c- Contaminants et toxines: bilan des données obtenues

La spiruline est susceptible de contenir divers contaminants en sus des espèces bactériennes considérées dans le suivi microbiologique. D'une part, des cyanobactéries d'autres genres et leurs toxines ont été mises en évidence dans des lots de spiruline à travers le monde. D'autre part, la présence d'éléments traces métalliques a été mentionnée dans de la spiruline sauvage ou de culture (saisine de l'ANSES n° 2014-SA-0096).

Dans le cadre des essais « bio » menés par l'ITAVI et l'ASTREDHOR-RATHO, le suivi de contaminants s'est limité aux cyanotoxines et cyanobactéries, les éléments métalliques étant déjà largement suivis par la FSF en culture conventionnelle (les intrants minéraux étant davantage susceptibles d'être contaminés par ces métaux lourds).

Depuis 2014, la FSF et le laboratoire Limnologie SARL développent une collaboration sur des actions de campagnes de suivi des contaminants en condition de production. Le laboratoire Limnologie SARL constitue progressivement une photothèque des cyanobactéries accompagnatrices de la spiruline pour les identifier. Si des cyanobactéries potentiellement toxiques sont identifiées, le producteur effectue un contrôle de microcystines. En l'absence de réglementation, le GBPH propose la limite de 1 µg/g pour la spiruline

Il est à noter que la production de cyanotoxines par le genre *Arthrospira* n'est pas décrite dans la littérature, à l'exception des travaux de Ballot et al. qui rapportent la présence de microcystines et d'anatoxine A dans deux échantillons de *A. fusiformis* isolés de certains lacs au Kenya (Ballot et al. 2004, Ballot et al. 2005, Krienitz et al. 2003) Si la majorité des études concluent à une absence de microcystines dans la spiruline (Rzymiski et al. 2015, Heussner et al. 2012, Manali et al. 2016, Vichi et al. 2012), celles-ci ont cependant été détectées dans des lots de spiruline avec des teneurs généralement de l'ordre de 0,1 µg/g. La monographie consacrée à *Arthrospira platensis* dans l'USP Dietary Supplements Compendium retient une teneur maximale en microcystines de 0,5 mg/kg par ELISA (USP 2015). En l'absence de réglementation, le GBPH propose la limite de 1 µg/g, norme calquée sur une réglementation existante pour la culture de l'algue Klamath (*Aphanizomenon flos-aquae*). Cette limite reste à valider par les autorités lors de la lecture du GBPH.

RÉSULTATS :

Deux types d'échantillons ont été envoyés à la Limnologie : milieux de culture et paillettes.

- Les milieux de culture ont été prélevés directement dans les bassins de culture à un point de prélèvement situé à environ 50 cm de la pompe de brassage. Chaque échantillon envoyé au laboratoire a été réalisé en prélevant un batch de trois répétitions pour chaque modalité testée.
- Les paillettes correspondent à la spiruline sèche. Chaque échantillon envoyé au laboratoire a été réalisé en prélevant un batch de trois répétitions pour chaque modalité testée.

→ Le laboratoire Limnologie fournit systématiquement des rapports présentant la flore observable en termes de % de colonies d'une part, et en termes de % de biomasse. Le % de colonies est un paramètre mettant en évidence une notion qualitative de « diversité floristique » sans pour autant donner une indication quantitative, paramètre plutôt décrit par % biomasse. Ainsi, ce second paramètre est révélateur de l'importance de la contamination en terme quantitatif, et le GBPH préconise de rester au-dessus de 99,6% d'*Arthrospira* en terme de biomasse. Les rapports mettent également en évidence les formes d'*Arthrospira* (droite, ondulée, spiralée).

Expérimentation N°3 : été 2018

Milieux de culture 18/07/2018	Conventionnel AADJ/10		Bio Alcali AADJ/10		Bio Sulfate d'ammonium AADJ/10	
	M2		M6		M8	
Modalité	% colonies	% biomasse	% colonies	% biomasse	% colonies	% biomasse
Référentiel	2	93,5	5,5	97	4,1	96,6
Total <i>Arthrospira</i>	0,2	39,7	0,5	51,4	0,6	52
<i>Arthrospira</i> droite	1,7	43,4	5	45,1	3,5	43,1
<i>Arthrospira</i> ondulée	0,2	10,5	0	0,6	0,1	1,6
<i>Arthrospira</i> spiralée	98	6,5	94,5	3	95,9	3,4
Autres cyanobactéries	0	0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Phormidium ^{(1) (2) (3) (4)}	5,1	3,7	6,1	2,2	8,7	2,4
Leptolyngbya ^{(1) (3)}	0	0	0	0	0	0
Pseudanabaena ^{(1) (2) (3)}	2	0,1	1,8	<0,1	2,9	0,1
Planktolyngbya ^{(1) (3)}	0,2	0,9	<0,1	0,1	0,1	0,2
Geitlerinema ^{(1) (2)}	8,5	0,1	1,6	<0,1	4,1	<0,1
Spirulina *	2	0	0,9	<0,1	1,5	<0,1
Gomontiella *	48,7	1	61,7	0,5	51,1	0,5
Jaaginema ⁽³⁾	0	0	0	0	0	0
Romeria *	25,9	0,3	20,9	0,1	23,2	0,1
Cyanobium ⁽¹⁾	4,8	0,1	1,4	<0,1	4,4	0,1
Cyanodictyon *	0	0	0	0	0	0
Merismopedia ⁽¹⁾	0,7	0,1	<0,1	<0,1	0,1	<0,1
Aphanocapsa ⁽¹⁾	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Autres embranchements	0	0	0	0	0	0
Chrysophycées (*)	0,25		0,35		0,19	
Microcystines (eq-LR, µg/litre)						

Paillettes 11/07/2018	Conventionnel AADJ/10		Bio Alcali AADJ/10		Bio Sulfate d'ammonium AADJ/10	
	M2		M6		M8	
Modalité	% colonies	% biomasse	% colonies	% biomasse	% colonies	% biomasse
Référentiel	46,4	99,6	52,7	99,9	48,4	99,9
Total <i>Arthrospira</i>	3,4	29,3	2,2	38,4	15,5	90,5
<i>Arthrospira</i> droite	37,8	51,2	50,3	60,8	27,1	6,7
<i>Arthrospira</i> ondulée	5,2	19,2	0,2	0,8	5,8	2,6
<i>Arthrospira</i> spiralée	53,6	0,4	47,3	<0,1	51,6	0,1
Autres cyanobactéries	0,2	0	0,2	<0,1	0,2	<0,1
Phormidium ^{(1) (2) (3) (4)}	13,7	0,2	0,4	<0,1	23,3	0,1
Leptolyngbya ^{(1) (3)}	0	0	0	0	0	0
Pseudanabaena ^{(1) (2) (3)}	6,9	0	2,2	<0,1	3,9	<0,1
Planktolyngbya ^{(1) (3)}	1,7	0,1	0,2	<0,1	0,2	<0,1
Geitlerinema ^{(1) (2)}	3,4	0	4,4	<0,1	1,9	<0,1
Spirulina *	0,2	0	0,4	<0,1	0,4	<0,1
Gomontiella *	3,4	0	2,2	<0,1	3,9	<0,1
Jaaginema ⁽³⁾	0	0	0	0	0	0
Romeria *	20,6	0	30,6	<0,1	15,5	<0,1
Cyanobium ⁽¹⁾	1,7	0	2,2	<0,1	0,4	<0,1
Cyanodictyon *	0	0	0	0	0	0
Merismopedia ⁽¹⁾	1,7	0	4,4	<0,1	1,9	<0,1
Aphanocapsa ⁽¹⁾	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Autres embranchements	0	0	0	0	0	0
Chrysophycées (*)	0,35		0,38		0,36	
Microcystines (eq-LR, µg/gramme)						

[1]: productrices potentielles de microcystine

[2]: productrices potentielles d'anatoxine/homoanatoxine

[3]: productrices potentielles de saxitoxine

[4]: productrices potentielles de cylindrospermopsine

* actuellement aucune information disponible sur le potentiel toxigène de ce genre

En terme de % biomasse, la spiruline sèche était systématiquement constituée d'au moins 99,6% d'*Arthrospira*, norme attendue par le GBPH, pour toutes les modalités testées, malgré le fait que la proportion d'*Arthrospira* ait été inférieure à 96% au sein du milieu de culture pour les trois modalités. Notons une quantité non négligeable de colonies d'autres cyanobactéries que ce soit dans le milieu de culture ou dans le produit fini, en terme de % de colonie, sans pour autant que cela soit problématique au vu du taux de microcystine. Que ce soit dans le milieu de culture ou dans les paillettes sèches, le taux de microcystines détecté est resté largement en dessous des normes préconisées (<1 µg/l pour le milieu de culture et <1 µg/g pour la spiruline sèche). Au global, sur le produit fini, aucune différence notable n'a été observé entre conventionnel et biologique. La forme ondulée et droite d'*Arthrospira* étaient en proportion similaire dans les milieux de culture, tandis que la forme ondulée était majoritaire dans le produit fini, ce qui suggère que la forme droite tend à être moins bien filtrée que les formes ondulées, ce qui induit que les droites retournent dans le milieu de culture, risquant ainsi une accumulation de ces dernières au cours du temps.

Expérimentation N°4 : été 2019

Milieux de culture 28/06/2019	Conventionnel AAPR		Conventionnel AADJ 10		Bio Sulfate d'ammonium AADJ/10		Bio Isotonic AADJ/10		Conventionnel / Effluents piscicoles	
	M1		M2		M8		M11		M12	
Modalité	% colonies	% biomasse	% colonies	% biomasse	% colonies	% biomasse	% colonies	% biomasse	% colonies	% biomasse
Référentiel	4	99,2	2,9	97,7	4,3	99,1	13,6	99,4	13,3	99,7
Total <i>Arthrospira</i>	0,1	0,8	0,2	3,1	0,4	5,4	1,4	7,6	1,8	7,7
<i>Arthrospira</i> droite	0,1	0,9	0,5	10,8	0,1	1,1	2,7	13,7	1,8	10,9
<i>Arthrospira</i> ondulée	3,9	97,4	2,3	83,7	3,9	92,7	9,5	78,2	9,8	81
<i>Arthrospira</i> spiralée	95,4	0,8	96,7	2,3	95,4	0,9	86,4	0,6	85,8	0,3
Autres cyanobactéries	0	0	0,3	0,5	0	0	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Phormidium ^{(1) (2) (3) (4)}	0,6	0,1	2,3	0,7	0,7	0,2	2,7	0,2	0,9	0,1
Leptolyngbya ^{(1) (3)}	8,1	0,1	6,8	0,1	3,2	<0,1	12,3	0,1	15,1	0,1
Pseudanabaena ^{(1) (2) (3)}	2,9	<0,1	0,5	<0,1	1,8	<0,1	1,4	<0,1	2,7	<0,1
Planktolyngbya ^{(1) (3)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Geitlerinema ^{(1) (2)}	13,3	0	23,2	0,1	32,7	0,1	53,2	<0,1	43,6	<0,1
Spirulina *	24,3	0,2	20,5	0,3	30,2	0,2	0	0	0	0
Gomontiella *	41	0,3	40	0,5	23,1	0,2	1,8	<0,1	15,1	<0,1
Jaaginema ⁽³⁾	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Romeria *	2,9	<0,1	0,9	<0,1	0,7	<0,1	0	0	5,3	<0,1
Cyanobium ⁽¹⁾	1,2	<0,1	1,4	<0,1	1,4	<0,1	12,3	0,1	0,9	<0,1
Cyanodictyon *	0	0	0	0	0,4	<0,1	2,7	<0,1	1,8	<0,1
Merismopedia ⁽¹⁾	1,2	<0,1	0,9	<0,1	1,1	<0,1	0	0	0,3	<0,1
Aphanocapsa ⁽¹⁾	0,6	<0,1	0,5	<0,1	0,4	<0,1	<0,1	<0,1	0,9	<0,1
Autres embranchements	0,6	<0,1	0,5	<0,1	0,4	<0,1	<0,1	<0,1	0,9	<0,1
Chrysophycées (*)	0,6	<0,1	0,5	<0,1	0,4	<0,1	<0,1	<0,1	0,9	<0,1
Microcystines (eq-LR, µg/litre)	0,18		0,15		0,22		<LQ		0,22	

Paillettes 28/06/2019	Conventionnel AAPR		Conventionnel AADJ 10		Bio Sulfate d'ammonium AADJ/10		Bio Isotonic AADJ/10		Conventionnel / Effluents piscicoles	
Modalité	M1		M2		M8		M11		M12	
Référentiel	% colonies	% biomasse	% colonies	% biomasse	% colonies	% biomasse	% colonies	% biomasse	% colonies	% biomasse
Total <i>Arthrospira</i>	95,7	99,9	85,5	99,8	96,7	99,9	95,6	99,9	94,6	99,9
<i>Arthrospira</i> droite	2,2	1,7	5,7	5,3	4,3	5,3	6,7	5,5	5,3	3
<i>Arthrospira</i> ondulée	4,3	4,1	5,7	5,2	2,2	3,5	6,7	4,7	21	22,5
<i>Arthrospira</i> spiralée	89,1	94,1	74,1	89,4	90,2	91,1	82,2	89,7	68,3	74,4
Autres cyanobactéries	4,3	<0,1	14,5	0,2	3,3	<0,1	4,4	<0,1	5,4	<0,1
<i>Phormidium</i> ^{(1) (2) (3) (4)}	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0,1	<0,1
<i>Leptolyngbya</i> ^{(1) (3)}	2,2	<0,1	11,4	0,1	1,1	<0,1	2,2	<0,1	1,3	<0,1
<i>Pseudanabaena</i> ^{(1) (2) (3)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Planktolyngbya</i> ^{(1) (3)}	2,2	<0,1	0	0	0	0	0	0	2,6	<0,1
<i>Geitlerinema</i> ^{(1) (2)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Spirulina</i> *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gomontiella</i> *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Jaaginema</i> ⁽³⁾	0	0	2,8	<0,1	1,1	<0,1	0	0	1,3	<0,1
<i>Romeria</i> *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cyanobium</i> ⁽¹⁾	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cyanodictyon</i> *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Merismopedia</i> ⁽¹⁾					1,1	<0,1	2,2	<0,1		
<i>Aphanocapsa</i> ⁽¹⁾	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autres embranchements	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Chrysoptycées (*)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Microcystines</i> (eq-LR, µg/g P Sec)	0,25		0,21		0,27		0,25		0,21	

[1]: productrices potentielles de microcystine

[2]: productrices potentielles d'anatoxine/homoanatoxine

[3]: productrices potentielles de saxitoxine

[4]: productrices potentielles de cylindrospermopsine

* actuellement aucune information disponible sur le potentiel toxigène de ce genre

En terme de % biomasse, la spiruline sèche était systématiquement constituée d'au moins 99,6% d'*Arthrospira*, norme attendue par le GBPH, pour toutes les modalités testées, malgré le fait que la proportion d'*Arthrospira* ait été inférieure à 97% au sein du milieu de culture pour certaines modalités. Notons une quantité non négligeable de colonies d'autres cyanobactéries dans le milieu de culture pour l'ensemble des modalités testées, tendance qui ne se répète étrangement pas dans les produits finis. Que ce soit dans le milieu de culture ou dans les paillettes sèches, le taux de microcystines détecté est resté largement en dessous des normes préconisées (<1 µg/l pour le milieu de culture et <1 µg/g pour la spiruline sèche). Au global, sur le produit fini, aucune différence notable n'a été observé entre conventionnel et biologique. La forme spiralée d'*Arthrospira* était largement dominante que ce soit dans le milieu de culture ou le produit fini : en effet, notre spiruline est passée d'une configuration majoritairement ondulée « Paracas » et droite en 2018 à une configuration majoritairement spiralée « Lonar » en 2019 pour des raisons indéterminées à ce jour.

DISCUSSION :

Rien à signaler sur les contaminations de la spiruline sèche par des cyanotoxines du type microcystines en culture biologique Il serait toutefois intéressant de poursuivre les campagnes d'analyse pour obtenir un panel d'échantillons représentatif et d'élargir les analyses aux anatoxines notamment.

Il est par contre extrêmement intéressant de constater qu'en un an, nos cultures de spiruline ont énormément évolué en terme de microflore accompagnatrice et surtout que la spiruline *Arthrospira* cultivée dans les bassins ont petit à petit évolué d'un mix de droites et d'ondulées à une quasi-totalité de spiralée et une proportion très faible de droite et d'ondulées. Cela laisse supposer que la forme droite de la spiruline est réversible, et que certaines conditions physico chimiques peuvent influencer sur la configuration spatiale des cellules de spiruline. La forme spiralée « Lonar » présente dans nos bassins en été 2019 est apparue non pas spontanément mais de manière progressive à partir de la fin de l'été 2018, d'abord dans un bassin puis petit à petit dans l'ensemble des bassins tests. Les facteurs de déclenchement de ces changements de morphologie et les mécanismes à l'œuvre demeurent encore

aujourd'hui assez obscurs (Whitton, 2012). Hongsthong et al. (2007), utilisant une approche protéomique, a conclu que la morphologie linéaire observée à la fois en laboratoire et en production pourraient être induits par un stress environnemental, tel que niveau d'oxygène, le niveau de dioxyde de carbone, la disponibilité des nutriments, le niveau de lumière, mais aussi par un changement dans un mécanisme de détermination de la forme d'une cellule.

d- Normes sanitaires : taux de sulfites

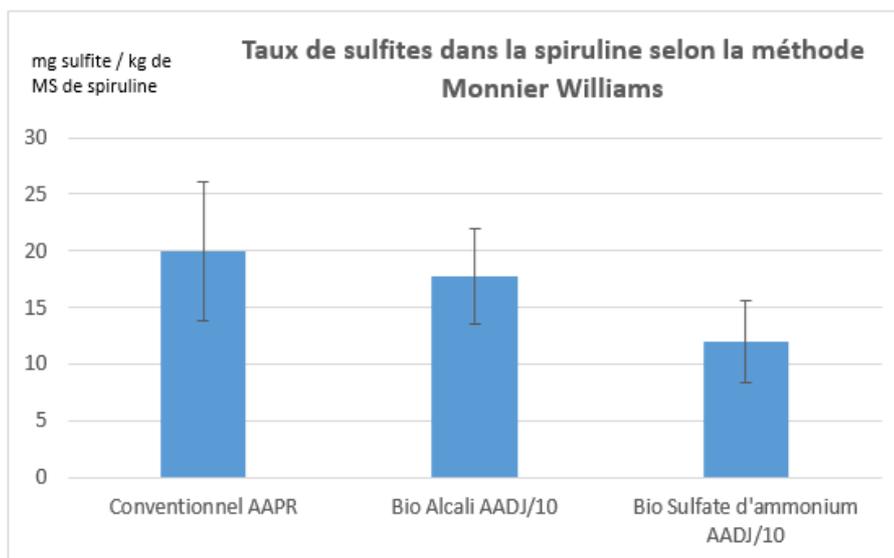
D'après une étude menée en Irlande, le dioxyde de soufre (sulfite) a été détecté dans tous les échantillons de poudres de chlorella et de spiruline échantillonnés par l'entreprise Nutrisure Ltd : les résultats se situaient entre 15 et 89 mg/kg avec une moyenne de 38 mg/kg. Les sulfites n'étaient pas utilisés dans la production ou la transformation des poudres de spiruline, et ont été détectés dans des échantillons provenant de différents producteurs et de différents pays d'origine.

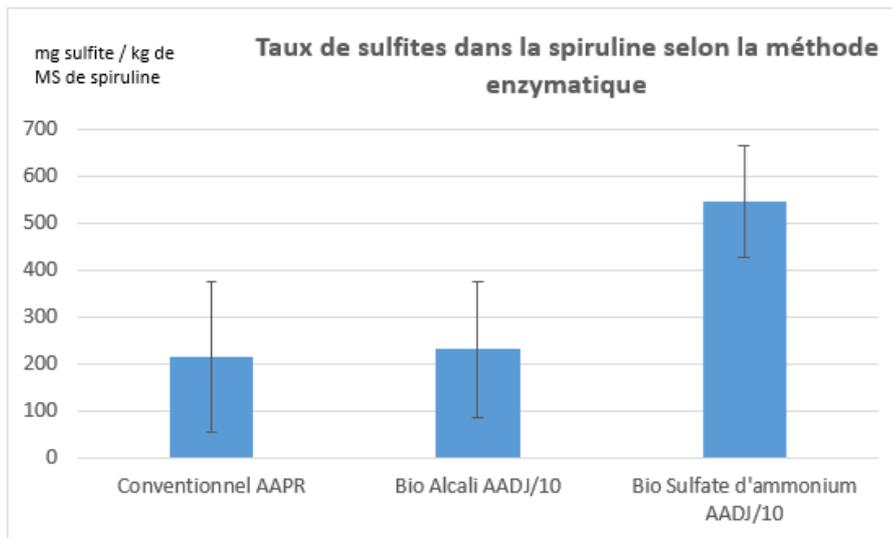
Or en France, d'après le décret n°2015-447 du 17 avril 2015 relatif à l'information des consommateurs sur les allergènes et les denrées alimentaires non préemballées, *"la présence de cet allergène devrait donc figurer sur l'étiquetage dans la liste des ingrédients de la denrée par une référence claire au nom de l'allergène"* lorsqu'il dépasse un taux de 10 mg/kg. C'est pourquoi le taux de sulfites a été suivi dans le cadre de l'étude CASDAR « Spiruline Paysanne ». Il existe 2 méthodes normées pour mesurer le taux de sulfites dans les aliments :

- NF EN 1988-1 : méthode optimisée de Monier-Williams
- NF EN 1988-2 : méthode enzymatique

Toutefois la matrice « spiruline sèche » est assez inédite pour les laboratoires d'analyse, et il a été décidé de comparer les deux méthodes afin de les comparer. Deux laboratoires ont été sollicités pour ce faire : le laboratoire Eurofins maîtrisant la technique « Monnier Williams » et la laboratoire AQMC maîtrisant la technique « enzymatique ». Les mesures ont été réalisées en triplicat sur des échantillons issus de trois modalités tests : conventionnel AAPR (M1), bio alcali AADJ/10 (M6) et bio sulfate d'ammonium AADJ/10.

RÉSULTATS :





DISCUSSIONS :

Les deux méthodes montrent des résultats très différents.

- Le laboratoire Eurofins a mesuré des taux de sulfites proches de ce qui avait été observé par l'entreprise Nutrisure lors de l'étude précédemment citée, sur un vaste panel d'échantillons. La moyenne obtenue sur le taux de sulfite était systématiquement au-dessus de 10 mg/kgMS pour l'ensemble des modalités testées. La modalité « bio sulfate d'ammonium AADJ/10 » présentait un taux légèrement plus faible que pour les deux autres modalités tests.
- La laboratoire AQMC a mesuré des taux de sulfite très importants, avec des écarts types énormes dans les mesures. La modalité « bio sulfate d'ammonium AADJ/10 » présentait cette fois ci un taux (550 mg/L en moyenne) beaucoup plus élevé que pour les deux autres modalités tests (200 mg/L en moyenne).

Il n'est pas possible à ce jour de décréter quel laboratoire aurait donné les résultats les plus proches de la réalité, ni quelle méthode de mesure aurait donné les valeurs les plus justes : mais il est possible d'affirmer que la répétabilité de la méthode Monnier Williams semble beaucoup plus forte (écart type plus faible), et que les valeurs obtenues avec le laboratoire Eurofins sont plus proches des valeurs obtenues dans le cadre de l'étude irlandaise. Les méthodes d'analyse auraient besoin d'être adaptées spécifiquement à la matrice spiruline (fraîche ou sèche), mais en attendant il semble raisonnable d'afficher la mention « contient des sulfites » sur les emballages de spiruline vendue dans le commerce.

4- Efficacité de l'utilisation de l'azote : bilan de matière azoté

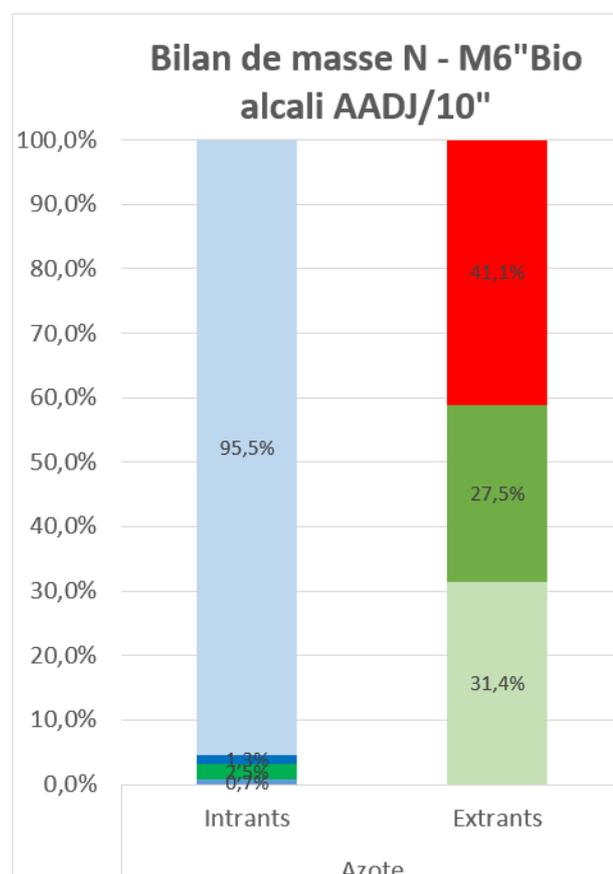
Un bilan de masse azoté a été réalisé en été 2018 (dans le cadre de l'expérimentation N°3), dans le but de comparer le bilan azoté entre une culture conventionnelle et une culture biologique. Comme précisé dans la partie A-II-6, le bilan de masse permet de faire un bilan entre les intrants et les extrants d'un système, et son application au cycle de l'azote dans le cadre de nos expérimentations permet de mesurer la dynamique de ce nutriment dans le système « culture de spiruline », de mesurer l'efficacité de l'utilisation de l'azote (EUA) selon les modalités culturales, ainsi que les rejets et/ou la fixation d'azote sous forme gazeuse par le milieu.

RÉSULTATS :

Le tableau ci-dessous récapitule les principales données utilisées pour réaliser ce bilan, ainsi que son mode de fonctionnement.

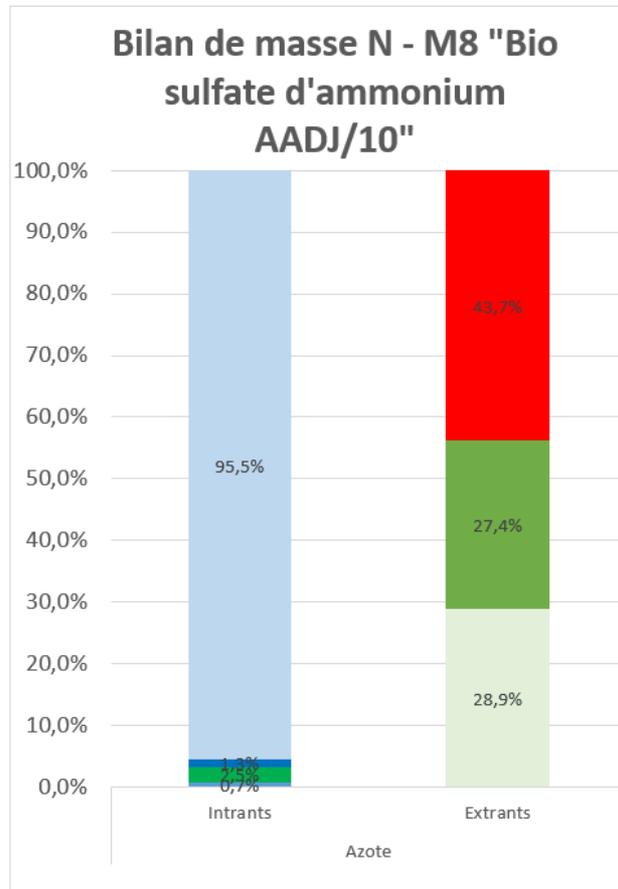
		Conventionnel AADJ/10	Bio Alcali AADJ/10	Bio Sulfate d'ammonium AADJ/10	
Intrants	Estimation azote en provenance de l'eau neuve dans le milieu de culture initial + compensation évaporation (g)	5,5	5,5	5,5	
	Estimation quantité azote apporté par la spiruline à l'ensemencement (g)	19,2	19,2	19,2	
	Azote apporté dans le milieu de culture initial (g)	N venant de l'urée	10,0	0	0
		N-NH4 intrants alcali et sulfNH4	0	10,0	10,0
		N-NH4 venant du phosphate monoammonique	24,4	0	0
	Azote apporté en phase de culture (g)	N-NO3 venant du nitrate de potasse	277,2	0	0
		N venant de l'urée	730,0	0	0
		N-NH4 intrants alcali et sulfNH4	0	730,0	730,0
	N-NH4 venant du phosphate monoammonique	8,2	0	0	
SOMME N intrants		1074,5	764,7	764,7	
Extrants	Spiruline sortie du système (somme des récoltes + résidus à TFinal) (gMS)	Spiruline récoltée (gMS)	1120,0	2206,4	1875,0
		Spiruline résiduelle (gMS)	396,5	359,6	318,1
		Taux de protéines dans la spiruline sèche	61,8%	58,5%	63,0%
	Azote fixé dans la spiruline sortie du système (g)		150,0	240,2	221,1
	Azote résiduel (azote global dans le milieu de culture) (g)		640,8	210,5	209,4
	SOMME N extrants		790,7	450,7	430,5
	Déduction estimation évaporation N sous forme de gaz (g)		283,8	314,0	334,2

Les tableaux ci-dessous représentent la répartition des intrants et des extrants en %. La somme des pourcentages est de 100% pour chaque colonne, les pertes nettes observées dans la partie extrant ayant été compensée par une catégorie « pertes par dégazage ».

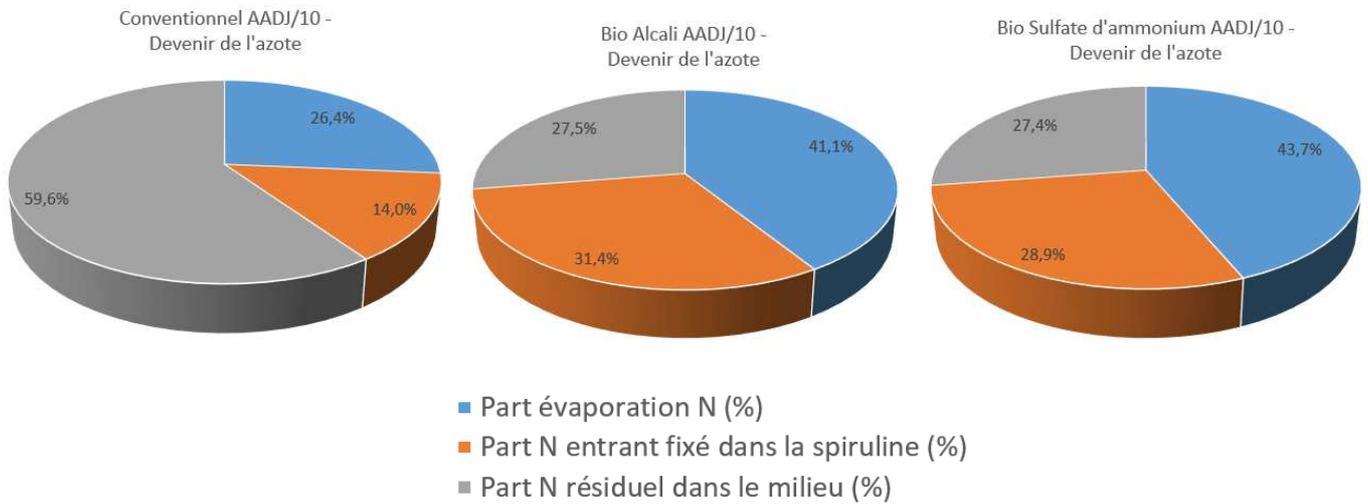


Légende :

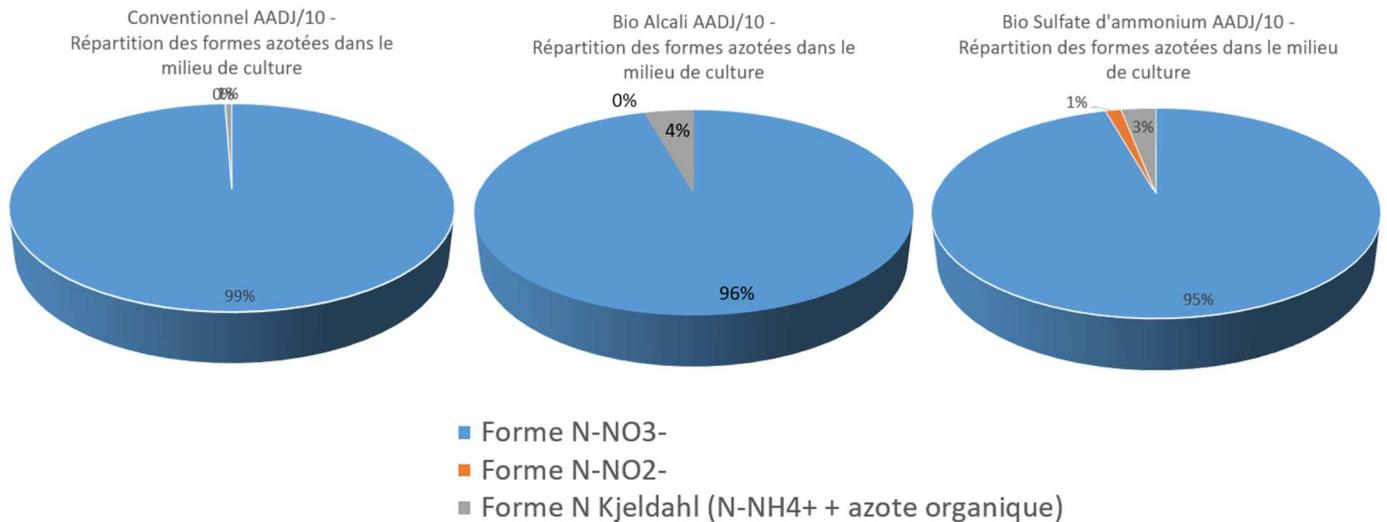
- Eau neuve
- Biomasse spiruline ensemencement
- Intrants azotés MC
- Intrants azotés MR
- Spiruline récoltée
- Azote résiduel milieu
- Pertes (Dégazage)



Autre représentation des données du devenir de l'azote :



Représentation de la répartition des formes de l'azote dans la part d'azote résiduel, dans le milieu de culture en fin d'expérimentation



Modes de calcul utilisés :

Intrants :

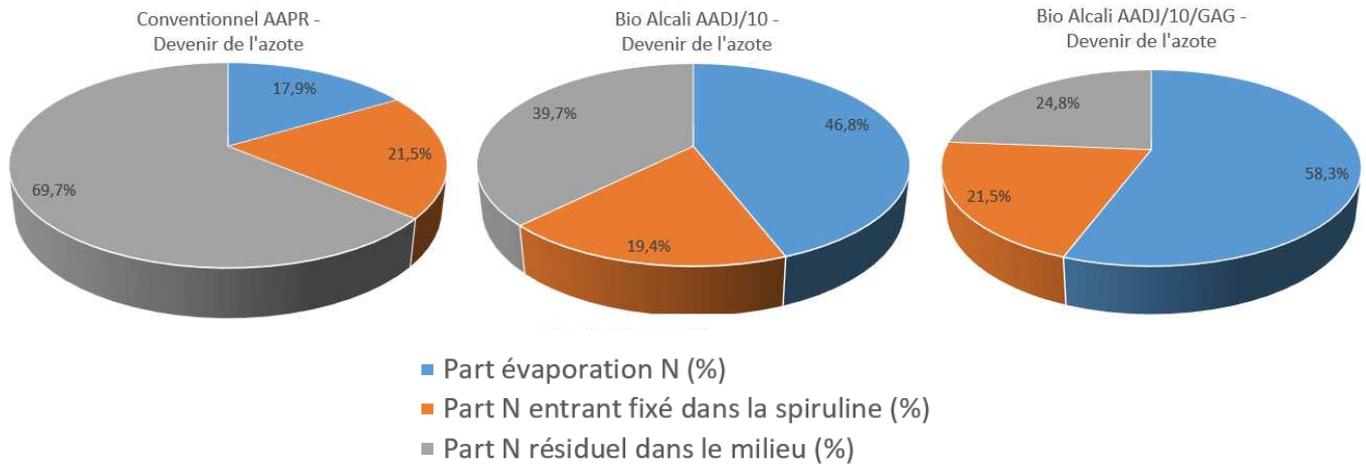
- La quantité d'azote apportée dans l'eau neuve a été quantifiée en multipliant le taux d'azote global dans l'eau de renouvellement par la quantité d'eau neuve ajoutée tout au long de la culture ;
- La quantité d'azote apportée par la spiruline à l'ensemencement a été estimée de la manière suivante : 20L de crème de spiruline à 1% de siccité environ a été ajoutée soit environ 200g d'équivalent en matière sèche ; la spiruline sèche contient environ 60% de protéines en moyenne, tandis que les protéines contiennent environ 16% d'azote, ce qui permet d'évaluer la quantité d'azote apporté par la biomasse de spiruline lors de l'ensemencement ;
- La quantité de chaque intrant apporté par modalité testée a été notée, et multipliée par le taux d'azote de chacun de ces intrants pour traduire ces apports en azote entrant.

Extrants :

- La spiruline récoltée au long de l'expérimentation ainsi que la spiruline résiduelle récupérée en fin d'expérimentation (récolte « totale » des bassins) a été quantifiée en matière fraîche et sèche, et le taux de protéines de la matière sèche a été mesuré afin de quantifier l'azote « fixé » par la spiruline, en partant du principes que les protéines contiennent environ 16% d'azote.
- La quantité d'azote résiduel dans le milieu de culture en fin d'expérimentation a été quantifiée pour connaître la teneur du milieu en azote, mais aussi pour décrire les différentes formes de l'azote en présence dans le milieu
- La différence Extrants-Intrants permettait d'aboutir à une valeur positive, ce qui implique une perte nette d'azote, sous forme gazeuse. Aucune instrumentation spécifique n'a été installée pour décrire la dynamique de ces rejets gazeux ni leur nature (protoxyde d'azote ou diazote).

Note : Un autre bilan de masse a été effectué en automne 2017 (dans le cadre de l'expérimentation N°2), en vue de comparer l'apport d'alcali AADJ/10 et l'apport d'alcali AADJ/10GAG. L'approche était toutefois moins précise : pas de données sur le taux de protéines de la spiruline récoltée donc simple estimation à 60% pour toutes les modalités, et pas de données sur le taux d'azote kjeldahl (qui comprend l'azote organique) sur le milieu de culture en fin d'expérimentation, ce qui implique la non

prise en compte des boues de culture. Il est toutefois intéressant de comparer les données acquises avec les données présentées ci-dessus sur l'expérimentation de l'été 2018.



DISCUSSIONS :

Les modalités biologiques ont pour particularité de rejeter 1,8 fois plus d'azote sous forme gazeuse que la modalité conventionnelle. En contrepartie, la modalité conventionnelle stocke jusqu'à trois fois plus d'azote sous forme ionique (principalement sous forme d'azote nitrique) dans le milieu de culture, notamment en raison de l'azote nitrique apporté lors de l'ensemencement, qui constitue 40 à 50% de l'azote résiduel dans le milieu à la fin de l'essai, le reste provenant à priori de transformations de l'urée en azote nitrique.

La nature « ammoniacale » de l'azote apporté aux modalités biologiques implique un rejet important de cet azote, en raison des conditions de température et de pH, propices à son dégazage sous forme NH₃. Pour autant, on note aussi une accumulation d'azote nitrique dans ces milieux : environ 95-96% de l'azote résiduel total est sous forme de nitrates pour les deux modalités biologiques, contre seulement 4-5% constitué par l'azote ammoniacal. Cette accumulation de nitrates s'est faite sans qu'aucune source de nitrates n'ait été utilisée, ce qui montre que l'azote ammoniacal apporté au milieu a été converti d'une manière ou d'une autre en nitrates. Les mécanismes en jeu sont probablement d'ordre bactérien, les bactéries nitrifiantes autotrophes étant probablement en cause (malgré l'absence de médias favorisant leur surface d'installation) vu l'alcalinité, le pH et le taux d'oxygène très propice à leur activité dans le contexte de production de spiruline. Ainsi, au même titre que pour l'urée en milieu conventionnel, l'azote ammoniacal apporté en milieu biologique - et non consommé par la spiruline - peut se retrouver sous forme de nitrates en solution, ou se dégazer et ainsi constituer une perte nette d'azote. Cette perte d'azote est plus élevée pour les modalités biologiques tandis que l'accumulation de nitrates en milieu conventionnel pose la question de la gestion des effluents lors des épisodes de « vidange » de milieux de culture, pratique commune dans la filière en raison de l'accumulation de sels.

Plus globalement, l'ensemble de ces éléments pose la question d'efficacité de l'utilisation de l'azote (EUA) en culture de spiruline, c'est-à-dire le taux d'azote entrant réellement fixé dans la spiruline. On observe en effet que l'apport d'azote en culture conventionnelle est plus élevé qu'en culture biologique, notamment en raison de la pratique visant à ajouter du nitrate de potasse pour constituer un « stock d'azote ». Pour autant, le rendement est aussi bon en culture biologique, voire parfois meilleur qu'en conventionnel, et le fait que l'on retrouve de l'azote résiduel dans le milieu montre bien que ce nutriment est utilisé de manière excessive par rapport aux réels besoins de la spiruline, dans un contexte de production artisanale. Dans le cas de l'expérimentation menée en été 2018, les

rendements ont été meilleurs en biologique qu'en conventionnel, et l'EUA était meilleure pour la modalité biologique, tandis qu'en automne 2017, l'EUA était similaire en biologique et en conventionnel. Dans tous les cas, en prenant en compte la part d'azote entrant fixé dans le milieu de culture (N résiduel), on peut estimer qu'il serait possible de réduire les apports azotés de 25 à 40% en culture biologique, et de 60 à 70% en culture conventionnelle. Concernant la culture biologique, on pourrait ainsi envisager de réduire les apports de dose journalière d'azote fixée à 10mg d'équivalent azote/L/jour à 2,5 à 5 mg d'équivalent azote/L/jour, ce qui est cohérent par rapport aux résultats obtenus lors de l'expérimentation sur l'utilisation d'effluents piscicoles, au terme de laquelle il avait été évalué qu'un apport de 2,5 mg d'équivalent azote/L/jour était suffisant pour combler les besoins de la spiruline en culture artisanale menée avec des effluents piscicoles.

Cependant, notons une nouvelle fois que les rendements obtenus dans ce cadre expérimental étaient relativement faibles par rapport aux rendements atteignables en production, et on peut aisément multiplier par deux les besoins journaliers de la spiruline en conditions optimales en visant un apport de 5 à 10 mg d'équivalent azote/L/jour. Cette gamme de concentration permet de satisfaire aux besoins de la spiruline tout en limitant l'accumulation d'azote dans le milieu et par la même l'impact environnemental de cette production.

Enfin, le bilan de masse effectué en automne 2017, malgré quelques approximations, conforte bien celui qui a été réalisé en été 2018 en termes d'ordre de grandeur de rejets azotés gazeux : il semble indiquer par ailleurs qu'un apport de l'alcali en goutte à goutte n'a pas un impact positif sur le dégazage de cet élément, probablement en raison de la surface d'échange trop importante des gouttes d'alcali avec l'air. Il est donc préconisé d'apporter les intrants ammoniacaux aux doses conseillées (5 à 10 mg/L/jour selon les références habituelles de rendement observées dans chaque contexte de production), et ce en un seul apport journalier sous réserve d'assurer une capacité de brassage du milieu suffisant. Il est possible également de faire cet apport en plusieurs fois dans une journée, en répartissant le volume dans plusieurs zones des bassins de culture afin de ne pas atteindre des concentrations trop importantes dans des zones très localisées.

Une conclusion importante de ces bilans de masse : la culture de spiruline, conventionnelle ou biologique, a plus tendance à rejeter de l'azote dans l'air qu'à en capter.

IV- Conclusion générale : préconisations

Les tests menés sur les intrants ont permis d'aboutir à des premiers éléments de réflexion ayant pour but de développer un cahier des charges pour la culture biologique. Plusieurs intrants azotés et phosphorés, minéraux ou organiques ont été testés dans le cadre des essais menés par l'ITAVI à l'ASTREDHOR-RATHO.

Intrants azotés :

Il s'avère que les intrants minéraux à base d'azote ammoniacal sont tout à fait utilisables en culture biologique, et ce sans impact négatif sur le rendement, ni sur la qualité du produit (sur les quelques paramètres nutritionnels étudiés, ni ses conditions sanitaires (microbiologie, cyanotoxines). Le protocole d'apport de l'intrant azoté n'est pas le même que ce que peuvent pratiquer la plupart des producteurs de spiruline : il se base sur un apport journalier d'azote ammoniacal à hauteur de 5 à 10 mg d'équivalent azote/L de milieu de culture/jour. Un apport plus concentré d'azote ammoniacal implique des dégâts sur la culture et n'est pas préconisé. L'apport ne devrait pas se faire en goutte à goutte, méthode sans impact sur le rendement mais impactant sur les rejets d'azote gazeux... sauf si le brassage de l'eau est trop faible pour assurer une homogénéisation rapide de l'intrant dans le milieu. Les intrants ammoniacaux ont pour défaut de rejeter davantage d'azote qu'en culture conventionnelle (17 à 26% de l'azote apporté en culture conventionnelle s'évacue sous forme gazeuse contre 41 à 58% en culture biologique d'après les approches bilan de masse effectuées sur l'élément azote ; par contre, ils permettent de moins accumuler d'azote dans le milieu de culture. De manière générale, une réflexion devrait être engagée sur la question spécifique de l'efficacité de l'utilisation de l'azote en culture de spiruline afin de limiter son utilisation et les rejets dans l'environnement. Une autre problématique rencontrée aujourd'hui est le sourcing de cet intrant, qui doit être formulé avec 100% de matière végétale : les intrants testés dans le cadre de cette étude ne sont pas 100% d'origine végétale : en effet, le process de compostage et/ou méthanisation mis au point par le fournisseur Alcyon (pour l'alcali) implique un mélange de matières végétales avec d'autres bio déchets, non compatibles avec la production de spiruline bio : un process spécifique doit donc être développé pour permettre par la suite d'aboutir à un intrant compatible avec le cahier des charges bio. Il en va de même pour le sulfate d'ammonium. De plus, les fournisseurs actuels risquent de ne pas réussir à répondre à la forte demande de la filière si tous les producteurs se convertissent en bio dans les prochaines années.

Les intrants organiques présentent un certain potentiel du point de vue technique (rendement, qualité du produit, paramètres sanitaires corrects à bons...) mais ils pèchent pour le moment par leur tarif très élevé : un petit benchmarking effectué sur les engrais azotés organiques ont permis de montrer que les tarifs rapportés au kilo de spiruline produite pouvaient évoluer entre 3 et 70 euros d'intrant azoté/kg de spiruline sèche contre 0,1 pour l'urée et 1,5 pour l'alcali/sulfate d'ammonium. D'autres tests sur des intrants formulés avec des matières premières différents devraient être menés par la suite pour évaluer la faisabilité technico économique.

Dans la suite des réflexions à mener sur la labellisation biologique, il serait intéressant de tester également des intrants biologiques d'origine « animale » : pour le moment le règlement bio européen ne le permet pas pour des raisons non explicites, mais des démarches sont en cours pour les autoriser. Ainsi, il serait possible d'utiliser des lixiviats de méthanisation (mix de matière végétale et animale), de l'alcali ou du sulfate d'ammonium issus de mix de matière animale et végétale, ou encore du guano.

En attendant, des tests ont déjà été réalisés chez des producteurs sur la fermentation de matière végétale par des levures spécifiques, afin de mettre au point un intrant fabriqué de manière artisanale ; cette piste d'étude devra être creusée pour évaluer son efficacité.

Intrants phosphorés :

L'acide phosphorique peut aisément remplacer le phosphate mon-ammonique sans impacter le rendement. Son prix étant également accessible (de l'ordre de 0,1 euros d'intrant phosphaté par kg de spiruline produite) rend assez évident le remplacement de l'intrant phosphoré conventionnel. Cependant, la question se pose sur la réelle compatibilité de cet intrant avec le mode de culture biologique, et d'autres solutions devraient être étudiées dans le cadre de la suite des réflexions à mener sur la labellisation biologique comme le guano ou les phosphates naturels tendres.

Les travaux menés sur la faisabilité technique de la culture biologique devront être complétés par une approche d'ordre économique pour évaluer finement l'impact du changement d'intrants sur le coût de production de la spiruline, mais aussi par des approches sociologiques (acceptabilité de ces intrants par les producteurs et les consommateurs) et environnementales (approche analyse de cycle de vie).

Bibliographie (*cf document spécifique listing biblio*)

https://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/couplage_metha_spiruline_ademe.pdf

<http://www.fao.org/3/a-az386e.pdf>

https://www.researchgate.net/publication/236010393_Ecology_of_Cyanobacteria_II

<https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT2014SA0096.pdf>

Programme CAS DAR 2016-2019 : « Spiruline paysanne »
Action : Tests de culture sur intrants biologiques
Catherine LEJOLIVET – Chargée de mission EPL LOZERE - LEGTPA Louis Pasteur



(Crédit : C.Lejlivet-2018)

Partenaires :



Sommaire	
1. Contexte de l'étude	3
2. Matériel et méthodes.....	3
2.1. Structures expérimentales	3
2.2. Matériel utilisé	5
*Matériel spécifique et stockage des intrants.....	5
*Matériel d'analyse.....	5
2.3. Méthodes	6
*Planning de routine	6
*Protocole Intrants « bio ».....	7
*Protocole d'étude de la conservation de la spiruline fraîche	8
3. Résultats et discussion.....	9
3.1. Analyse des facteurs environnementaux de culture	9
*Température.....	9
*pH	10
*Electroconductivité	12
*Disque de Secchi – Turbidité et Matières sèches.....	13
*Analyses des matières azotées.....	14
3.2. Rendements de production pour les 2 milieux « bio » vs milieu conventionnel.....	16
3.3. Analyse bactériologique des cultures et suivi de qualité de la spiruline fraîche	19
3.4. Analyse floristique des cultures et microcystines.....	21
CONCLUSION	22
ANNEXES.....	24
Annexe 1 : MILIEU DE CULTURE.....	24
Annexe 2 : MILIEU DE RECOLTE	24
Annexe 3 : Fiche technique produit ALCALI.....	25
Annexe 4 : Fiche technique produit SULFATE D'AMMONIUM	26

1. Contexte de l'étude

L'objet de l'étude confiée au LEGTPA Louis Pasteur de La Canourgue est de comparer les rendements de production de spiruline selon différentes modalités de couverture des besoins en azote et phosphore : produits minéraux autorisés ou potentiellement autorisables en mode de culture biologique : alcali-sulfate d'ammonium-acide phosphorique *versus* produits conventionnels : urée-phosphate mono-ammonique.

Rappels : Sur le site de La Canourgue, lors des essais 2017 intrants azote, les meilleurs résultats de productivité ont été obtenus avec l'intrant Alcali, puis le sulfate d'ammonium. Les bassins conventionnels (urée) ont donné les moins bons résultats sur 20 semaines de production : 0.67g/m²/j (urée) ; 1.63 g/m²/j (ammonium) et 2.84g/m²/j pour alcali.

L'effet bassin (subcarré/rectangulaire pour 590L/840L) et l'effet hauteur de culture (26cm/18cm) couplés à des valeurs de pH moins basiques (9.8+/-0.16 pour la modalité urée et pour l'alcali 10.46+/-0.31) pourraient peut-être expliquer les moins bonnes performances pour le milieu conventionnel. Une réorganisation des structures expérimentales permet en 2018 de réduire les potentiels biais évoqués.

L'unité étant située en Lozère à 600m d'altitude sous une serre non chauffée, l'expérimentation ne peut être conduite que sur une période relativement courte en intégrant la période d'extension de culture sur la période de juin. Le nombre de bassins expérimentaux de surface et volume représentatifs est limité à 4 unités ce qui induit des tests successifs sur la période pour garantir la création de répétitions, sans possibilité actuellement de comparer simultanément plus de 2 modalités.

2. Matériel et méthodes

2.1. Structures expérimentales

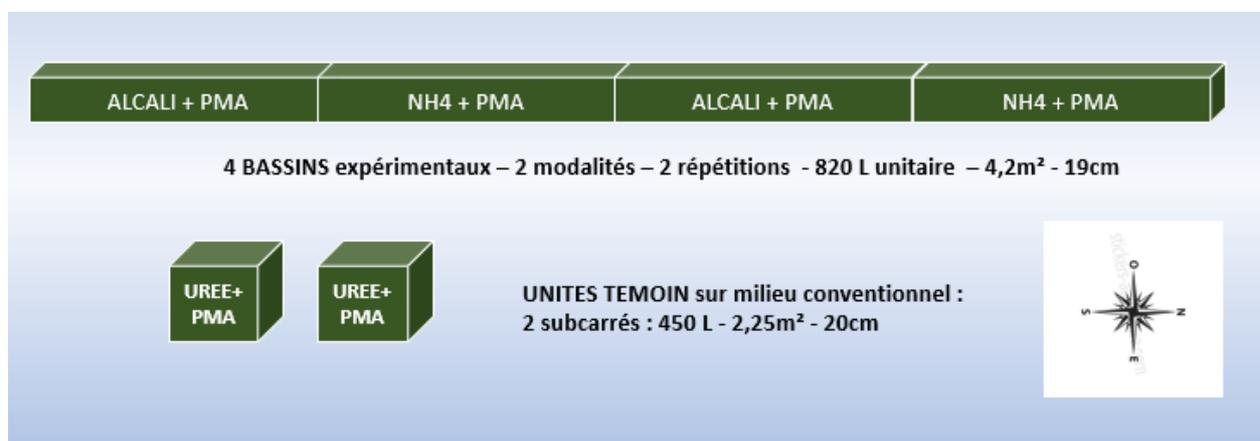
L'ensemble des unités est installé dans une serre Spid jumelée à double paroi gonflable de 400m². Cette serre est utilisée pour la conduite de programme d'expérimentations en aquaponie ; les bassins de spiruline se situent à proximité immédiate de cultures de fraises, d'aromatiques, de salades, de fleurs, etc...

La serre est équipée d'ouvrants en toiture dont l'ouverture est conditionnée par une consigne appliquée à une sonde de mesure de la température de l'air, située au-dessus des bassins expérimentaux. Dans ce programme, la consigne est réglée à 18°C.

4 bassins de 820 L (4.2m² * 0.19m) sont utilisés pour tester successivement les protocoles ci-après. Ils sont orientés nord-sud. Pour limiter l'effet positionnement, chaque cas expérimental a une répétition alternée à celle de l'autre cas



Protocole 2017 (rappel)

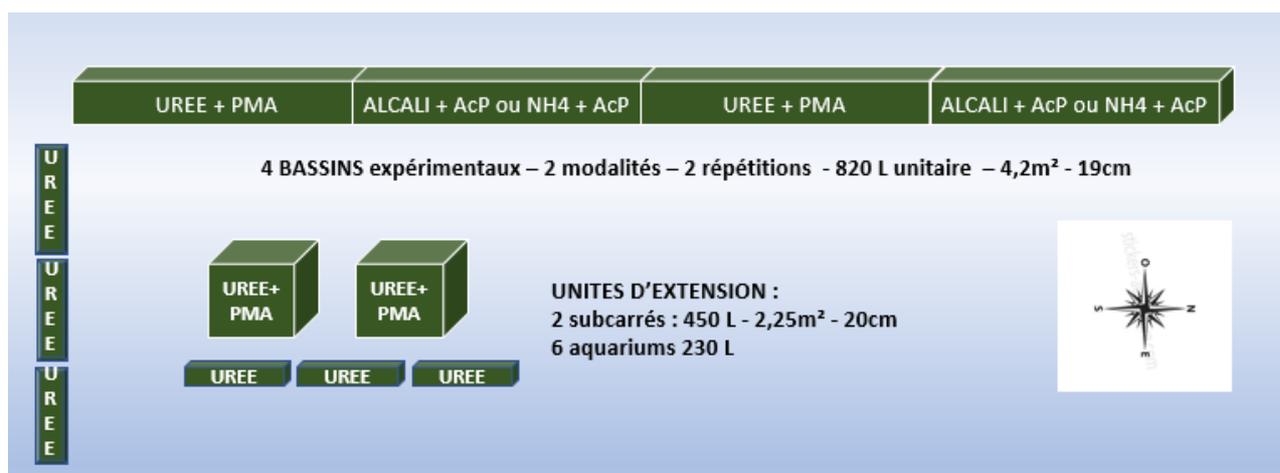


(PMA : phosphate mono-ammonique NH4 : sulfate d'ammonium)

Remarque :

En 2017, les bassins témoin étaient les bassins subcarrés de 450 L ; les différences de brassage et de hauteur de culture ont potentiellement créé des biais pour l'expérimentation. Aussi, il a été décidé de conserver ces 2 bassins comme structures d'extension de souche pour 2018 et de n'utiliser que les 4 grands bassins de 820 L unitaire comme bassins d'expérimentation (cf. schéma ci-dessous).

Protocole 2018



AcP : acide phosphorique

Ce choix a donc induit une succession dans le temps des 2 protocoles tests intrants bio vs milieu conventionnel (cf. 2.3 Méthodes)

Le brassage est assuré par des pompes Turbelle Nanostream 6065 (max : 4,5m³. h⁻¹). Deux pompes sont utilisées par bassin et placées en diagonale opposée afin de créer un courant régulier elliptique. Initialement, les mêmes programmations de brassage que l'année précédente sont appliquées : 15mn toutes les 30mn de 05h à 22h et 15mn toutes les heures de 22h à 05h du matin.

A l'issue de la première récolte obtenue courant juin sur un bassin Urée + PMA, il a été décidé d'effectuer un brassage continu 24/24 en raison de la stagnation fréquente de crème dans 1 coin du bassin. Toute l'expérimentation de mi-juillet à mi-octobre a donc été effectuée en brassage continu jour-nuit.

6 aquariums de 230 L unitaire et les 2 bassins subcarrés de 450 L unitaire sont installés en entrée de serre côté sud, pour assurer l'extension de la souche et permettre de constituer les volumes de crème nécessaire à l'ensemencement des bassins expérimentaux. Une toile d'ombrage est prévue si nécessaire pour chaque unité. Le brassage des cultures des aquariums est assuré par aération via une soufflante et une clarinette lestée de la longueur de chaque aquarium. Le bullage est continu 24/24. Le brassage des 2 bassins subcarrés est assuré par une Turbelle Nanostream 6045 (24h/24). A l'issue du démarrage des protocoles, ces unités sont conduites classiquement sur milieu conventionnel, avec récoltes régulières afin de conserver des volumes de secours.

2.2. Matériel utilisé

**Matériel spécifique et stockage des intrants*

Les 12 unités ont leur propre éponge de nettoyage. Un jeu d'épuisettes désinfecté à chaque utilisation est utilisé pour la récupération de débris ou d'insectes noyés dans les cultures. Un bac de désinfection de matériel est renouvelé chaque semaine avec une solution de Virakil (solution à 1%) ; le matériel est rincé systématiquement après désinfection à l'eau du réseau. Les intrants minéraux sont stockés dans un local frais et à l'obscurité.

**Matériel d'analyse*

Les matériels de suivi des cultures sont : un multi-paramètres Hach-Lange HQ40d (T°C, pH, O₂, EC), un spectrophotomètre Hach DR2800 et DR 4000 (réactifs micro-méthodes-LCK pour azote ammoniacal et nitrates, essentiellement), un disque de Secchi « maison ».

Les autres analyses biologiques (populations bactériennes, liste floristique et microcystines) sont réalisées par des laboratoires extérieurs (LDA Mende, Limnologie SARL de M. Pitois, respectivement).

L'analyse microbiologique de la spiruline fraîche en fonction de la durée de conservation n'a pu être conduite que sur le protocole 2 (sulfate ammonium + Acide phosphorique vs Urée + phosphate mono-ammonique ; cf. protocole spécifique)

Pour la récolte et le pressage, différents matériels sont utilisés après désinfection et rinçage à l'eau de source : cadre de toile 300µ, toile de 30µ, pot d'écumage, pot de récolte, presse manuelle, raclette, cuillère, ...



2.3. Méthodes

**Planning de routine*

Tout intervenant respecte les conditions d'hygiène (désinfection des mains à l'éthanol et utilisation exclusive de matériel désinfecté et séché) et de sécurité (notamment pour la manipulation des intrants avec blouse, lunettes, gants et masque pour certains produits) pour réaliser les milieux de culture et de récolte, les suivis quotidiens et les opérations de récolte et le pressage.

Les contrôles présentés dans le tableau ci-après sont systématiquement réalisés pour chaque unité expérimentale sur les plages 08-09h et 16-17h. Les mesures physico-chimiques sont effectuées en situation de brassage. Les échantillons de spiruline fraîche pressée, destinés à l'analyse de poids sec sont constitués le matin à l'issue de la récolte.

Paramètre	Matin	Après-midi
Odeur, couleur, aspect	Du lundi au dimanche	Du lundi au dimanche
T°air, T°eau, pH, EC, Secchi, O2	Du lundi au dimanche (multi paramètres Hach)	Du lundi au dimanche
N-NH ₄ ⁺ et N-NO ₃ ⁻	Ponctuellement avant apport (spectrophotomètre DR2800)	*
Densité optique (560-800nm)		1fois/semaine veille récolte avec DR2800/4000)
Nettoyage des bords et extraction des débris	Du lundi au dimanche	*
Compensation évaporation	Du lundi au dimanche avec eau de source	*
Apport N sur la base d'un apport de 10mg/L/j de N-NH ₄ ⁺	Du lundi au vendredi après compensation évaporation. Jeûne le week-end	*
Récolte et apport milieu de récolte	Par écrémage le matin après arrêt brassage pendant la nuit précédente 1 fois par semaine à Secchi 1.5-2cm → secchi 3.5-4cm	*
Poids sec	1 fois par récolte sur 20-50g de spiruline pressée – 6h à 40°C et pesée avec balance de laboratoire (0,001g)	
Observations microscopiques	2 fois / mois sous Microscope Nikon	
Analyses bactériologiques (Labo Départemental) et floristiques + Microcystines (Sarl Limnologie)	Bactério : 1 fois au cours du protocole : Urée +PMA vs Sulf.ammonium + Ac. phosphorique. Flore : différents échantillons ont été analysés pour le protocole 1 en phase de canicule et 1 fois au cours de septembre (protocole 2)	

L'eau des milieux (culture et récolte) et de compensation de l'évaporation est l'eau de source de St Fréal, (source karstique). Cette résurgence est située à 150m du site et acheminée par un canal ouvert jusqu'à la pisciculture du lycée. L'accès à cette eau se fait via un piquage indépendant et spécifique à la serre aquaponique. Cette ressource en eau est suivie régulièrement du point de vue physico-chimique (*exigences de l'arrêté préfectoral de pisciculture cf. annexe N°*).

Les analyses bactériologiques sont réalisées sur la biomasse fraîche (pas de protocole prévu sur la spiruline sèche pour le Site de La Canourgue) en intégrant l'étude de la DLC à J1, J2, J4.

***Protocole Intrants « bio »**

(cf. annexes 1 et 2 pour milieux de culture et milieux de récolte)

Comparativement à l'expérimentation 2017, l'apport d'azote est réduit à 10mg N-NH₄⁺/ L / j (2017 : 20mg N-NH₄⁺ /L/j), 5j/7. La concentration en azote des intrants de base a été vérifiée en début d'expérimentation et sont conformes à la fiche technique.

****Protocole 1 – Alkali + AcP vs milieu conventionnel : 16/07-27/08/18 (7 semaines)**

Les milieux de culture et de récolte conventionnels sont ceux appliqués par de nombreux spiruliniers. La source azotée est l'Urée qui approvisionne la spiruline en azote ammoniacal après dissolution et hydrolyse (source préférentielle pour l'assimilation azotée).

L'azote est apporté de manière journalière dans ce protocole 2018 pour créer une concentration de 10mg N-NH₄⁺/l/j, sans tenir compte de la biomasse récoltée (contrairement à ce que font certains producteurs). Le nitrate de potassium (KNO₃) est apporté en guise de source de potassium, cet intrant constitue une réserve de nitrates, source azotée qui peut être utilisée par la spiruline en cas de carence en ammoniacque.

La source de phosphore est constituée de phosphate mono-ammonique pour le milieu conventionnel et ne peut obtenir le label « bio ».

La modalité « bio » est constitué d'ALCALI (20.5%) pour la source azotée. Cet engrais minéral est fabriqué par l'entreprise ALCION par distillation de déchets végétaux méthanisés, de composts et de déchets agroalimentaire et stripping. L'apport est effectué tous les matins sauf le week-end et pour obtenir également une concentration de 10mg N-NH₄⁺ /L/j. *(NB : la concentration de la solution brute a été vérifiée en début d'expérimentation)*

Le 2^e élément majeur testé de la modalité est la source de phosphore. L'ACIDE PHOSPHORIQUE (AcP) est un engrais phosphaté obtenu par l'entreprise EXTRAMER à partir de macro-algues marines.

La préparation des milieux de culture est effectuée 24h-48h avant le démarrage de la culture. La soude (NaOH-90%) est apportée en premier pour assurer la désinfection du milieu et généré un pH initial de minimum 9.5. Le bassin expérimental estensemencé à partir de 5 à 6L de crème de spiruline (4-5% poids sec), soit 6.7 L par m³).

-NB : la crème de spiruline est issue des 2 unités de production des bassins subcarrés, voire à des aquariums si nécessaire.

****Protocole 2 - Sulfate d'ammonium + AcP vs milieu conventionnel : 29/08-11/10/18**

A l'issue de la dernière récolte du protocole 1, fin août, pour éviter toute influence d'historique de bassin, ceux-ci sont vidangés vers une zone de lagunage après récolte (plan d'eau de 400m² et 600m³, soit 0,6 % du volume du plan d'eau). Les bassins sont nettoyés et désinfectés.

La source azotée testée dans le cadre du protocole 2 est le SULFATE D'AMMONIUM. C'est un engrais issu de l'entreprise SUEZ après stripping d'ammoniacal à partir de produits des traitements des eaux usées. La quantité apportée chaque jour correspond, comme précédemment, à un apport d'azote de 10mg N-NH₄⁺/L/j.

L'acide phosphorique est apporté de manière identique au protocole 1.

***Protocole d'étude de la conservation de la spiruline fraîche**

Un protocole d'étude de conservation a été mis en place avec les collègues de l'atelier agro-alimentaire de Florac (EPLEFPA LOZERE). Il a été conduit lors du protocole 2, fin septembre.

Il a été décidé compte-tenu du budget disponible de faire réaliser par le Laboratoire départemental des analyses microbiologiques sur de la spiruline fraîche récoltée le 24/09 dans 4 bassins expérimentaux (Urée 1, Urée 2 ; NH₄ 1, NH₄ 2) sur des échantillons à J0, J1, J2, J4 conservés en sac plastique alimentaire sous-vide, soit 16 échantillons de 100g au total. La préparation des échantillons a été effectuée dans la pièce de conditionnement de l'atelier de transformation de la pisciculture du lycée après désinfection du matériel.

Un protocole de refroidissement a également été suivi selon le planning ci-dessous, lors du transfert vers le laboratoire d'analyse :

-Durée du trajet entre zone de conditionnement et le laboratoire d'analyses : 50 minutes

-Mise en glacière de l'ensemble (enceinte à 3°C) à la suite du conditionnement.

-Mesure de la température par thermomètre à sonde à cœur de différents sachets témoins, un pour chaque milieu de culture.

Milieu	Heure	Température (°C)
UREE 1	9h37 (mise en glacière)	13,8
NH4 1	9h52 (mise en glacière)	15,3
UREE 2	10h03 (mise en glacière)	14,3
NH4 2	10h15 (mise en glacière)	18
UREE 1	10h45	6,2
NH4 1	10h46	7,8
UREE 2	10h47	13,7
NH4 2	10h48	13,5
UREE 1	11h10 (arrivée au LDA)	6
NH4 1	11h11 (arrivée au LDA)	8
UREE 2	11h12 (arrivée au LDA)	10,5
NH4 2	11h13 (arrivée au LDA)	12,4

Préleveur : M. Yoann
ROBERT – Atelier agro-
alimentaire de Florac

3. Résultats et discussion

3.1. Analyse des facteurs environnementaux de culture

*Température

Les relevés quotidiens de température des bassins expérimentaux montrent pour les 2 protocoles une certaine homogénéité selon les différentes structures, notamment vérifiée par le nombre de °C x j encaissé par les cultures, à durée d'étude équivalente.

Fig. 1 : Suivi température - Protocole 1 - La Canourgue 2018

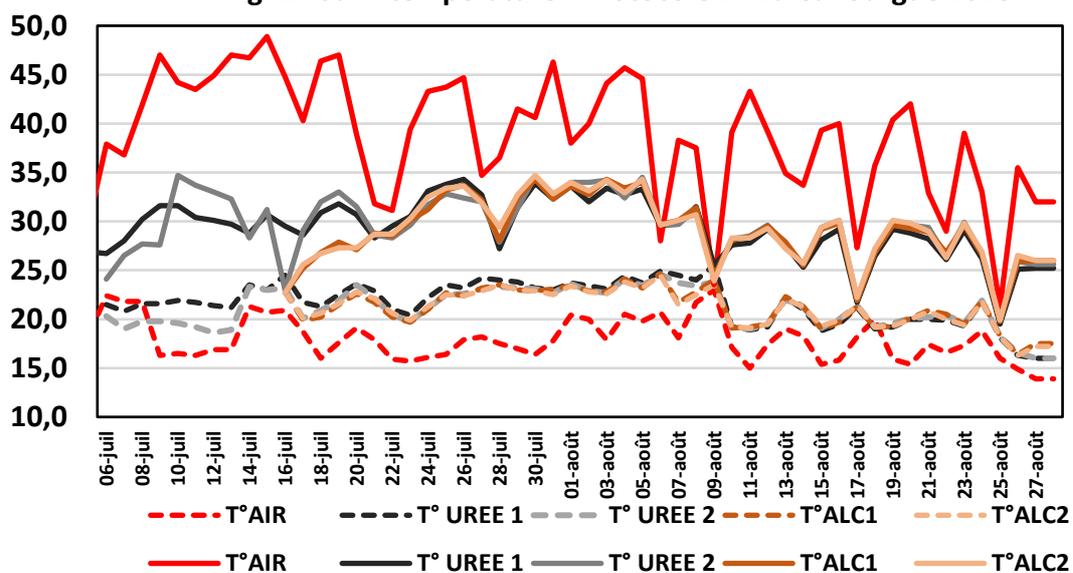
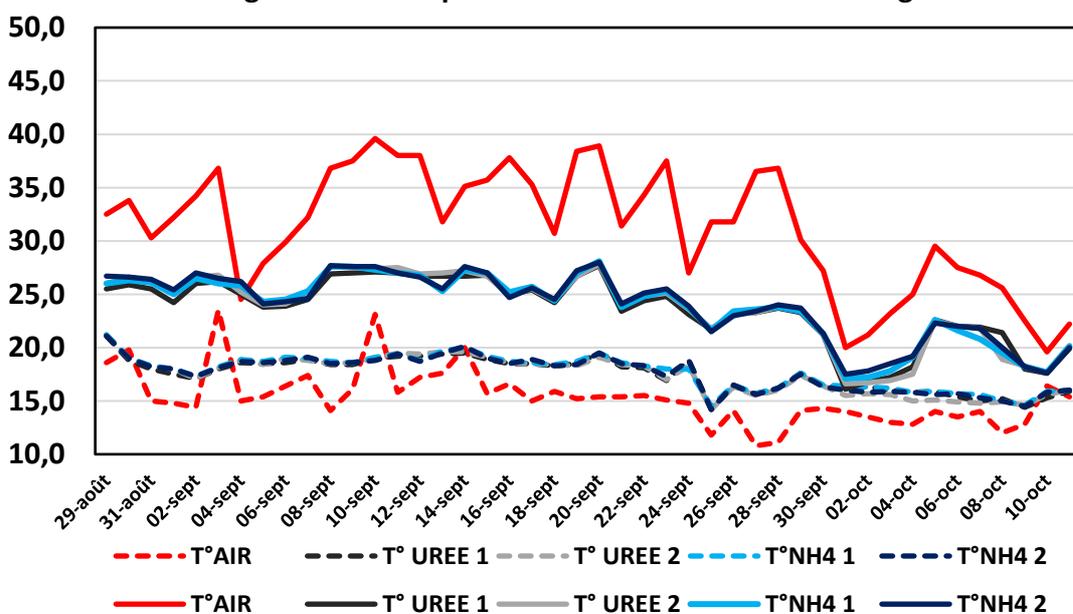


Fig. 2 : Suivi Température - Protocole 2 - La Canourgue



Tab. I : Température des cultures PROTOCOLE 1 : 16/07-27/08 - 7s

	AIR	UREE 1	UREE 2	ALCALI 1	ALCALI 2
Moy.08h	18,5	21,6	21,0	21,2	21,1
ET	2,74	2,07	2,13	1,99	1,95
Moy.16h	39,8	28,8	29,4	28,9	29,1
ET	6,21	3,06	3,42	3,42	3,46
Moy.générale	27,9	24,5	25,2	25,1	25,1
ET	11,74	4,45	5,08	4,79	4,87
°C*j	1990	1354	1342	1081	1083

Tab. II : Température des cultures PROTOCOLE 2 : 29/08 - 11/10 - 7s

	AIR	UREE 1	UREE 2	NH4 1	NH4 2
Moy.08h	15,4	17,5	17,5	17,7	17,6
ET	2,63	1,62	1,76	1,61	1,66
Moy.16h	31,3	23,6	23,8	23,8	24,0
ET	5,67	3,14	3,35	3,18	3,13
Moy.générale	23,3	20,6	20,6	20,8	20,8
ET	9,12	3,94	4,14	3,98	4,07
°C*j	1026	915	907	913	914

Le positionnement Nord-Sud des 4 bassins couplé à une proximité des portes coulissantes de la serre pour le bassin Urée 1 n'impacte pas ce paramètre. Les fortes chaleurs estivales, créant sur plusieurs semaines des températures ambiantes supérieures à 40-45°C n'ont pas provoqué de montées de température supérieures à 34,7°C. Lors du protocole 2 (fin août – mi-octobre), la température minimale enregistrée était de 14,2°C et la valeur maximale de 28,1°C.

***pH**

Le pH a été régulé à 9,5 en démarrage de culture par ajout de soude (90%). Consécutivement au développement de la spiruline et à l'apport de bicarbonate de soude à chaque récolte, ce paramètre, présenté en moyenne journalière, est resté dans la plage optimale. Pour le protocole 1, les valeurs moyennes de 9,8 (+/- 0,16) - 9,9 (+/-0,17) et 10 (+/-0,26 ou 0,30) sont constatés respectivement pour le milieu conventionnel et le milieu Alcali. Lors de la 2^e expérimentation, le pH moyen du milieu conventionnel a été de 9,9 (+/-0,19) comparativement au milieu sulfate d'ammonium : 9,9 (+/-0,18) – 9,8 (+/-0,18).

L'observation des valeurs enregistrées quotidiennement matin et après-midi donne des valeurs maximales de 10,46 et 10,1 respectivement pour les protocoles 1 et 2.

Fig.3 : Suivi du pH moyen - Protocole 1 - La Canourgue 2018

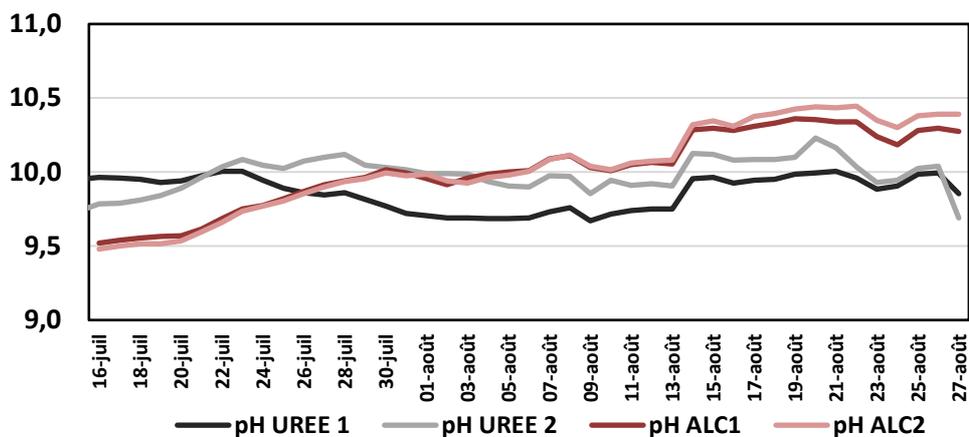
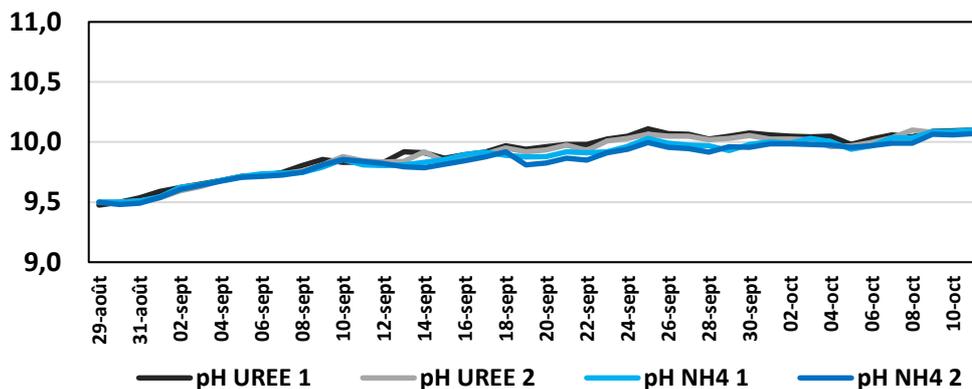


Fig. 4 : Suivi du pH moyen - Protocole 2 - La Canourgue 2018



Tab. III : pH cultures PROTOCOLE 1 : 16/07-27/08 - 7s

	UREE 1	UREE 2	ALCALI 1	ALCALI 2
Moy.08h	9,8	10,0	10,0	10,0
ET	0,15	0,17	0,26	0,30
Moy.16h	9,8	9,9	10,0	10,0
ET	0,16	0,16	0,25	0,30
Moy.générale	9,8	9,9	10,0	10,0
ET	0,16	0,17	0,26	0,30

Tab. IV : pH cultures PROTOCOLE 2 : 29/08 - 11/10 - 7s

	UREE 1	UREE 2	NH4 1	NH4 2
Moy.08h	9,9	9,9	9,9	9,9
ET	0,20	0,20	0,20	0,19
Moy.16h	9,9	9,9	9,8	9,8
ET	0,17	0,18	0,16	0,16
Moy.générale	9,9	9,9	9,9	9,8
ET	0,19	0,19	0,18	0,18

***Electroconductivité**

Les valeurs enregistrées au cours des 2 protocoles successifs ont peu varié et sont très proches.

Fig. 5 : EC moy. (mS.cm⁻¹) - Protocole 1 - La Canourgue 2018

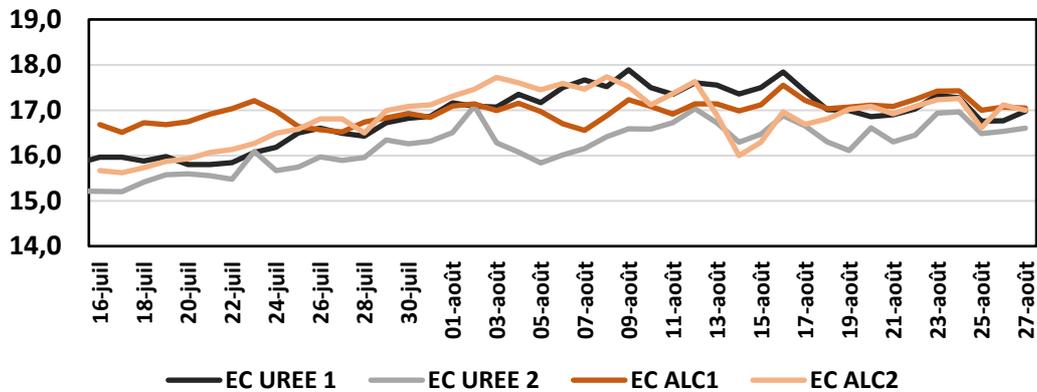


Fig. 6 : EC moy. (mS.cm⁻¹) - Protocole 2 - La Canourgue

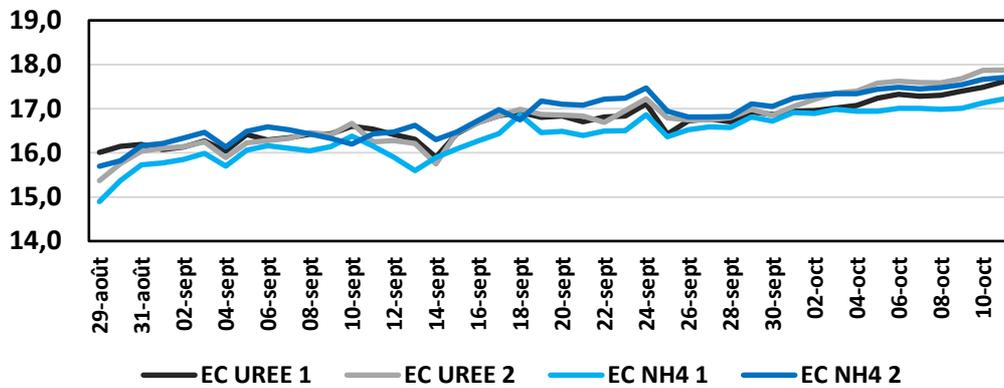


Tableau V : EC (mS.cm⁻¹) cultures PROTOCOLE 1 : 16/07-27/08 - 7s

	UREE 1	UREE 2	ALCALI 1	ALCALI 2
Moy.08h	16,5	16,0	16,9	16,8
ET	0,87	0,56	0,27	0,72
Moy.16h	16,4	16,1	17,0	16,9
ET	0,80	0,62	0,31	0,62
Moy.générale	16,4	16,1	17,0	16,8
ET	0,79	0,59	0,29	0,66

Tableau VI : EC (mS.cm⁻¹) cultures PROTOCOLE 2 : 29/08 - 11/10 - 7s

	UREE 1	UREE 2	NH4 1	NH4 2
Moy.08h	16,6	16,7	16,3	16,8
ET	0,44	0,65	0,56	0,58
Moy.16h	16,8	16,8	16,5	16,9
ET	0,44	0,57	0,52	0,47
Moy.générale	16,7	16,7	16,4	16,8
ET	0,45	0,61	0,54	0,53

Les valeurs moyennes restent comprises dans des intervalles classiques de 16,1 à 17 mS.cm⁻¹. Les valeurs minimales enregistrées sont respectivement de 15,06 et 14,81 pour les protocoles 1 et 2 ; les valeurs maximales entre 18,07 et 17,92. Les facteurs climatiques de la serre (évaporation plus ou moins forte) parallèlement à la gestion d'apport d'eau neuve expliquent le peu de variations constatées).

***Disque de Secchi – Turbidité et Matières sèches**

Les valeurs du disque de Secchi varient en fonction de la croissance des cultures. En pleine période d'activité, la valeur de Secchi 3-3.5 cm obtenue après récolte diminuait en 1 semaine à 10j pour atteindre la valeur de 1.2-1.5 cm, indicatrice d'une densification de la biomasse prête à être récoltée. Aucun incident de mort subite, partielle ou majeure de la culture n'a été constaté, susceptible de créer une augmentation rapide de la valeur du disque de Secchi.

Lorsque des cellules sont en suspension dans un milieu liquide traversé par un faisceau lumineux monochromatique, la quantité de lumière absorbée par la suspension est proportionnelle à la concentration des cellules. La relation entre absorbance et concentration en cellules est linéaire dans une gamme de concentrations couvrant environ un ordre de grandeur. Dans le cadre de cette étude il a été établi une gamme étalon d'échantillons de culture en début de programme pour la mesure de l'absorbance à 2 longueurs d'onde : 560 et 800 nm, mesures mises en corrélation avec la teneur en matières sèches de chacun de ces échantillons. La lecture d'absorbance à 800nm intègre la présence des petits trichomes de quelques ondulations, traduisant l'expansion de la culture. Ces courbes d'étalonnage permettent de prédire la quantité de matières sèches récoltables dans les bassins. L'application du modèle est opérationnelle à condition de réaliser un prélèvement de bassin le plus représentatif de la culture. Par contre, la quantité prévisionnelle de matières sèches ne peut être que supérieure à celle récoltée en réalité puisqu'il est nécessaire de ne pas appauvrir le bassin en période de production, sinon le risque de photolyse est fortement aggravé.

Fig. 7 : SPIRULINE 2018 - La Canourgue

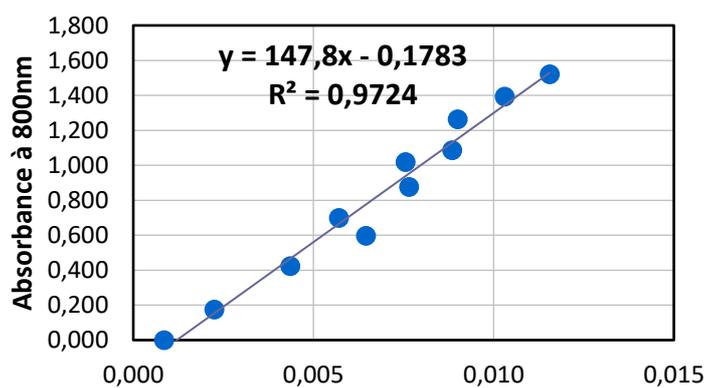
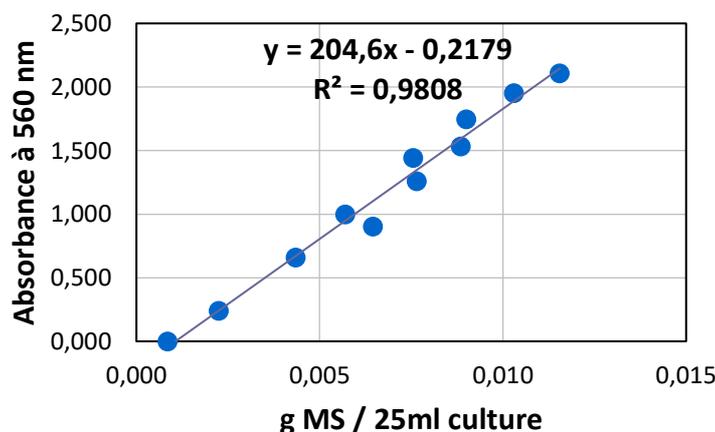


Fig. 8 : SPIRULINE 2018 - La Canourgue



*Analyses des matières azotées

**Azote ammoniacal

Fig. 9 : PROTOCOLE 1 - Suivi de $N-NH_4^+$ pré récolte et pré jeûne du weekend

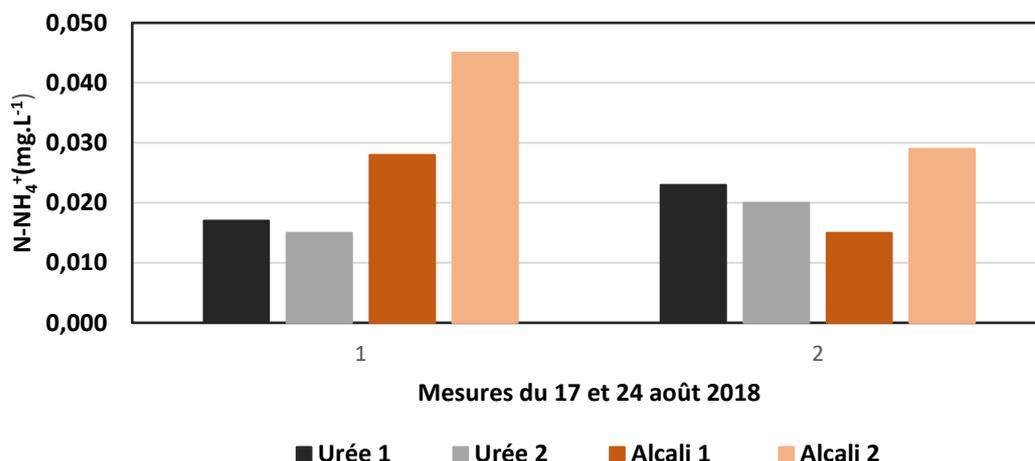
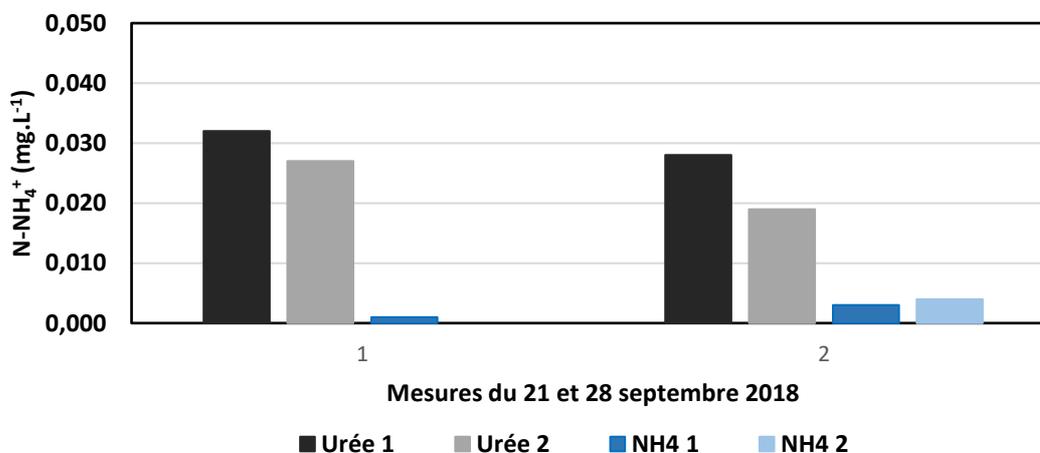


Fig. 10 : PROTOCOLE 2 - Suivi de $N-NH_4^+$ pré récolte et pré jeûne du weekend



Pour les 2 protocoles, 2 mesures sont effectuées au cours des 7 semaines d'expérimentation. Les dates d'analyse correspondent à des vendredis, c'est-à-dire avant la récolte du début de semaine suivante et avant la période de weekend pendant laquelle un jeûne d'azote est effectué (arrêt d'apport d'urée, d'alcali ou de sulfate d'ammonium). Les prélèvements ont été réalisés le matin juste avant le dernier apport d'azote de la semaine. Les concentrations en azote ammoniacal sont similaires entre les bassins expérimentaux Urée et Alkali exception faite pour un bassin Alkali lors de la 1^{ère} mesure. Lors du protocole 2, les valeurs sont supérieures pour les 2 bassins conventionnels comparativement à la modalité sulfate d'ammonium. Néanmoins, l'ensemble des valeurs mesurées montre que l'azote est fortement assimilé par les cultures.

Le pH des cultures est plutôt alcalin en se situant en moyenne aux alentours de 10 ce qui permet de réduire les proliférations de certaines bactéries pathogènes dans les bassins et l'installation de microalgues compétitrices comme la Chlorelle. Cependant, au cours des périodes de fortes chaleurs, le taux de dissociation de l'azote ammoniacal sous forme NH_3 gazeux est très important : 89% à pH 10 et température de 30°C et potentiellement toxique. De plus très volatile sous cette forme, il pourrait disparaître physiquement des cultures notamment en cas de fort brassage.

JP. Jourdan (manuel 02/02/18) précise que c'est effectivement l'ammoniac libre NH_3 qui est toxique plutôt que l'ion ammonium NH_4 , ce qui expliquerait que des doses d'ammonium + ammoniac très supérieures à 30 ppm puissent ne pas être toxiques à bas pH. La souche ondulée (Paracas) résiste à 75 ppm de NH_3 à pH 10,5 à 20 °C, du moins pendant un ou deux jours.

Dans le cas expérimental notamment de 2018, des faibles concentrations sont enregistrées comparativement à d'autres sites expérimentaux (exemple : 1 à 2mg/L N-NH_4^+ environ mesuré pour les milieux conventionnels par exemple à la station Ratho).

***Azote nitreux*

Fig. 11 : Suivi de N-NO_3^- pré récolte et pré jeûne du weekend

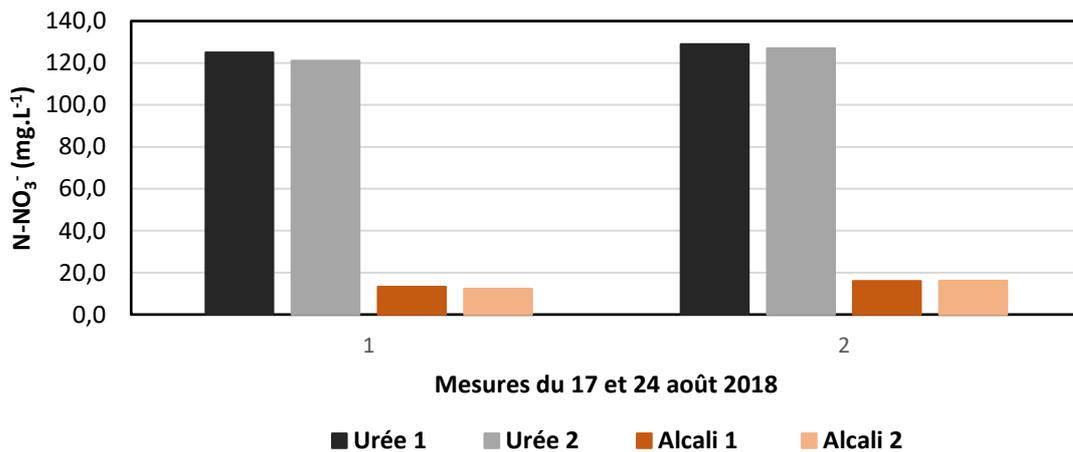
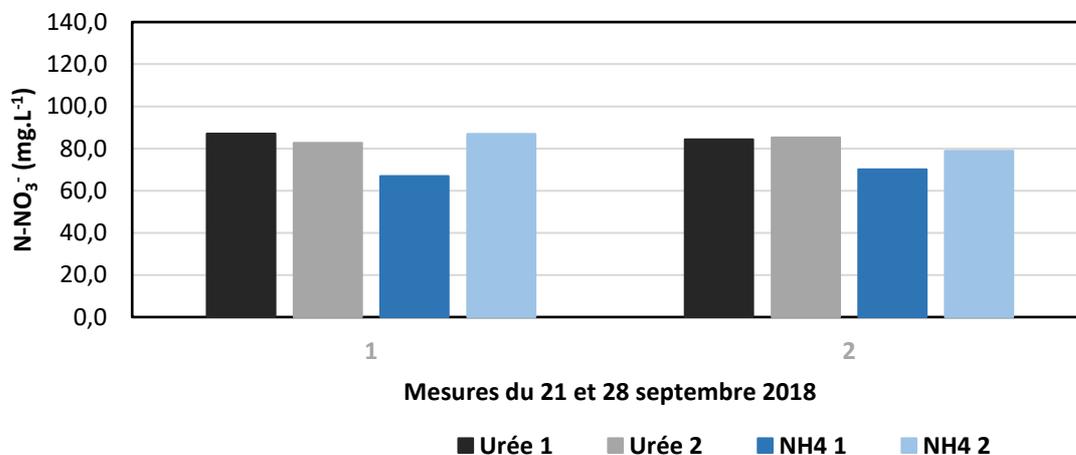


Fig. 12 : Suivi de N-NO_3^- pré récolte et pré jeûne du weekend



Les concentrations mesurées à une semaine d'intervalle avant le jeûne de week-end mettent en évidence une présence en nitrates plus ou moins importante dans les bassins modalité Alkali et Sulfate d'Ammonium. Ces 2 milieux de culture n'ont pas, contrairement à la modalité urée de source initiale de nitrates. Les bactéries nitrifiantes qui se développent dans le bassin en présence d'azote ammoniacal contribuent donc à la production de cette source azotée, assimilable par la spiruline également. Les différences constatées entre les 2 protocoles sont à mettre en relation avec l'activité métabolique de la spiruline, plus consommatrice d'azote en période estivale, d'autant plus si on lui procure sous une forme facilement assimilable telle que l'ammoniaque.

3.2. Rendements de production pour les 2 milieux « bio » vs milieu conventionnel

Les quantités récoltées par équivalent m^2 et jour, pour les 2 protocoles et chaque récolte, sont présentés dans les figures 12 et 13. Le tableau VII présente le total de spiruline sèche récoltée sur chacun des bassins expérimentaux et le rendement total exprimé en g/m^2 et $g/m^2/j$.

Fig. 12 : Urée vs Alkali - 16 07 au 27 08 18 - La Canourgue

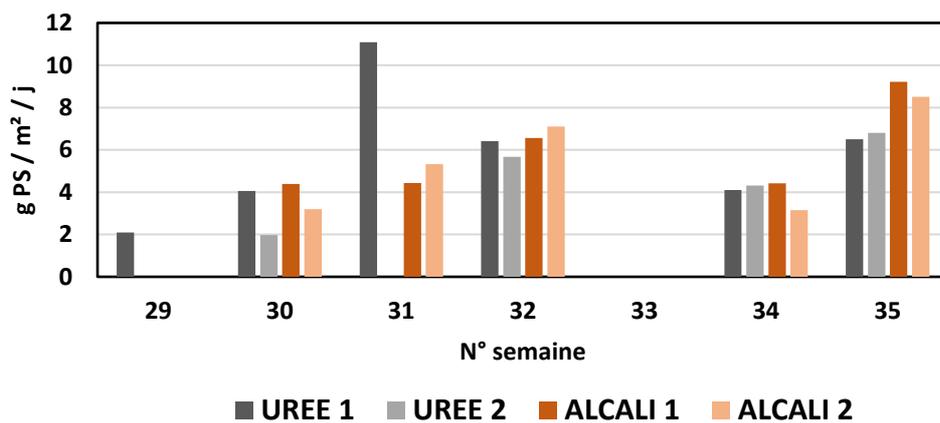
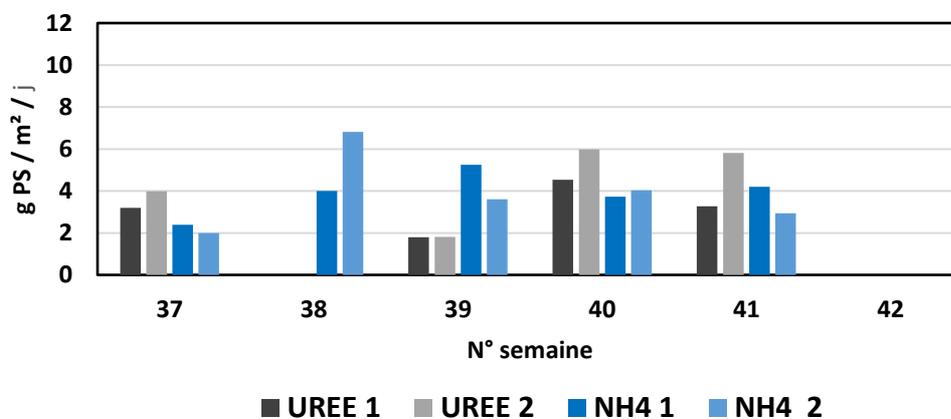


Fig. 13 : Urée vs Sulf. NH4 - 29 08 au 26 10 18 La Canourgue



Tab. VII : PRODUCTION DE SPIRULINE 2018 LA CANOURGUE - gPS total - /m² - /m²/j

UREE + PMA vs ALCALI + AC.PHOSPHORIQUE

sur période 16/07 - 27/08

UREE + PMA vs SULF.AMMONIUM + AC.PHOSPHORIQUE

sur période 29/08 - 11/10

	UREE 1-1 (52j)	UREE 2-1 (52j)	ALCALI 1 (42j)	ALCALI 2 (42j)	UREE 1-2 (42j)	UREE 2-2 (42j)	NH4 1 (43j)	NH4 2 (43j)
g PS tot	1113,6	844,8	951,9	858,4	541,7	730,8	665,1	646,4
g PS /m ²	265,1	201,1	226,7	204,4	129,0	174,0	158,4	153,9
g /m ² /j	5,1	3,9	5,4	4,9	3,1	4,1	3,7	3,6
Moyenne	4,48		5,13		3,61		3,63	
gain %	*		14%				1%	
°C* j	1354	1342	1081	1083				

Globalement, les récoltes ont été plus abondantes au cours du premier protocole (Urée vs Alkali-AcP) en raison de conditions climatiques plus favorables : plus de 1000 °Cj encaissés par les cultures pour le protocole 1 et inférieur à 920 °Cj pour le protocole 2 (Urée vs sulfate d'ammonium-AcP).

Quels que soient le protocole et les bassins expérimentaux, le rendement de production est compris entre **3,1 et 5,4g/m² PS/j, pour une période de suivi de 7 semaines.**

Pour le protocole 1, conduit en période estivale, le rendement moyen le plus élevé est obtenu avec le milieu BIO : **5,1g/m²/j contre 4,5g/m²/j, soit un gain de 14%.**

Par contre à l'issue du protocole 2, conduit de fin août à mi-octobre, les productions freinées naturellement par des conditions thermiques moins favorables, sont par contre similaires pour les 2 milieux testés, **soit 3,6g PS/m²/j.**

Il est à rappeler qu'aucun incident de production, de physico-chimie défavorable, au sein des structures n'a été décelé au cours de cette expérimentation qui pourrait perturber l'interprétation des résultats.

Compte-tenu de l'impossibilité de travailler sur de nombreuses répétitions intra-modalités en raison des structures disponibles et en raison de l'étude de 2 milieux « bio » en suivant dans le temps et non pas simultanément, le traitement statistique des données n'est pas envisageable. Il a été privilégié de travailler ainsi sur du volume expérimental plutôt que sur de la démultiplication de petites unités.

Néanmoins, ces résultats sont encourageants quant aux performances obtenues avec des intrants « bio » comparativement au milieu conventionnel tout en réduisant la source journalière d'azote à 10mg N-NH₄⁺/L /j.

Rappel 2017 :

Le tableau VIII présente synthétiquement les résultats obtenus pour 2017 dans des conditions expérimentales toutefois différentes quant à la conduite des modalités :

- 2 bassins urée de hauteur de culture plus importante et ayant subi des baisses de pH,
- la conduite par contre simultanée des 2 milieux bio du point de vue azote (la source de phosphore restant le phosphate monoammonique comme le milieu conventionnel),
- un apport 7/7 d'azote à 20mg N-NH₄⁺/L /j.

Tab.VIII : PRODUCTION DE SPIRULINE 2017 - LA CANOURGUE

Programme 2017 : de S25 à S35 - 23/06 au 03/09 - 73j						
BASSINS	Urée1	Urée2	Alca1	Alca2	NH4-1	NH4-2
surface (m ²)	1,96	1,96	4,27	4,27	4,27	4,27
TOTAL PS (g)	185,1	225,6	1371,4	1693,2	1143,7	1028,4
TOTAL PS g/m ²	94,4	115,1	321,2	396,5	267,8	240,8
Moyenne PS g/m ² /j	1,29	1,58	4,40	5,43	3,67	3,30
Moyenne par modalité	1,44		4,92		3,48	
DIFFERENTIEL	Référence		243%		143%	
de S36 à S45 : du 04/09 au 10/11 : 63j						
BASSINS	Urée1	Urée2	Alca1	Alca2	NH4-1	NH4-2
TOTAL PS (g)	49,7	55,0	419,4	359,5	207,3	267,2
TOTAL PS g/m ²	25,4	28,1	98,2	84,2	48,6	62,6
Moyenne PS g/m ² /j	0,40	0,45	1,56	1,34	0,77	0,99
Moyenne par modalité	0,42		1,45		0,88	
DIFFERENTIEL	Référence		241%		108%	

Donc des conditions expérimentales suffisamment différentes pour ne pas pousser l'analyse comparative des 2 années. De plus, les gains spectaculaires obtenus avec les milieux Alcali+PMA et NH₄+PMA comparativement au milieu conventionnel Urée+PMA résultent de conditions de culture non optimales pour les 2 bassins urée ayant montré des signes de détresse à plusieurs reprises (baisse de Secchi par exemple).

Par contre, si on compare les résultats obtenus pour les 2 années avec les modalités d'azote « bio », on retrouve les mêmes ordres de grandeur en production de biomasse sèche avec de meilleurs résultats pour les 2 années, avec la source alcali. La réduction de 50% de l'apport d'azote permet même d'obtenir des résultats au moins équivalents, sous conditions environnementales favorables (période estivale notamment).

3.3. Analyse bactériologique des cultures et suivi de qualité de la spiruline fraîche

Le Tableau VIII présente la synthèse des résultats d'analyses microbiologiques réalisés par le laboratoire départemental de la Lozère, le 24/09/18 sur des échantillons J0 lors du protocole 2 (Urée vs Sulfate d'ammonium) mais également lors des tests DLC sous vide à J1, J2, J4.

Les échantillons « *modalité sulfate d'ammonium* » présentent une flore significative de Clostridium, contraignant le laboratoire à effectuer une dilution décimale supplémentaire. Les commentaires supplémentaires obtenus sont les suivants :

«... Lorsque l'on est obligé de faire une dilution décimale supplémentaire pour être capable de compter les boîtes("éclaircir"), comme c'est un dénombrement nous avons obligation "mathématique" de changer la limite : < 10 UFC/g devient < 100 UFC/g si une dilution décimale supplémentaire est nécessaire pour compter et < 1000 UFC/g si deux dilutions décimales en cascade sont nécessaires.

Cela ne veut pas dire que l'on a trouvé des Clostridium perfringens mais que la limite dénombrement sur cet échantillon n'est plus la même et donc n'est plus <10 UFC/g, qui est aussi la limite de conformité.

On ne peut donc pas rendre de conclusion de conformité (ni conforme, ni non conforme) car nous n'avons pas pu lire jusqu'à la limite de conformité préconisée. Cela arrive assez souvent lorsque les échantillons sont contaminés ou trop "chargés" : ce sont les limites naturelles de la microbiologie.

*D'autre part quand on rend Clostridium spp, cela veut dire que les bactéries identifiées partiellement appartiennent au **genre Clostridium** mais que l'identification jusqu'à l'espèce est impossible avec les méthodes classiques.*

Enfin, si l'on ne rend pas un nombre précis de Clostridium perfringens (exemple 1800) ou au-dessus des limites : > 10, > 100, > 1000, cela signifie quand considérant les critères d'identification de la méthode normée utilisée, aucune bactérie n'a été identifiée comme Clostridium perfringens.

Toutefois nous savons qu'il y a dans certains échantillons des Clostridium dont on ne peut préjuger d'une pathogénicité éventuelle même opportuniste : il se peut que cela soit seulement des Clostridium commensaux non pathogènes, eu égard à la probabilité de présence dans l'environnement mais nous n'avons aucune assurance... »

Tab. VIII : ANALYSE MICROBIOLOGIQUE SPIRULINE FRAICHE - LA CANOURGUE 2018

Modalité Urée + PMA vs Sulfate d'ammonium + Ac. Phosphorique Suivis à J1 J2 J4 - conditionnement sous-vide

		UREE 1				UREE 2			
Paramètres :	NORMES	J0	J1	J2	J4	J0	J1	J2	J4
ASR	<100	<10	<40	40	<40	<10	<10	<10	<10
Coliformes	<100	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Cl. perfringens	<10	<10	<100	<10	<10	<100	<100	<100	<100
Es. coli	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Listeria	absence	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Flore totale	<100 000	<100 000	<100 000	<100 000	<100 000	<100 000	<100 000	<100 000	150000
Salmonella	absence	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Staph. Coag. +	<100	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Remarque :		1500 Clos.	1000 Clos.	950 Clos.	1200 Clos	3800 Clos.	2300 Clos	2300 Clos	2000 Clos

		NH4 1				NH4 2			
Paramètres :	NORMES	J0	J1	J2	J4	J0	J1	J2	J4
ASR	<100	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Coliformes	<100	280	<40	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Cl. perfringens	<10	<100	<100	<100	<100	<1000	<1000	<1000	<1000
Es. coli	<10	<40	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Listeria	absence	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Flore totale	<100 000	310000	<100 000	<100 000	810000	<100 000	<100 000	<100 000	<100 000
Salmonella	absence	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Staph. Coag. +	<100	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Remarque :		9500 Clos.	3800 Clos	6200 Clos	4300 Clos	19000 Clos	3600 Clos	41000 Clos	28000

Concernant les autres micro-organismes, il apparait une concentration de coliformes supérieure à la norme requise dans un des 2 milieux Sulfate d'ammonium, même constat pour la flore totale. La mise sous-vide tend à réduire ensuite la concentration de ces micro-organismes. Les normes sont ensuite respectées, quels que soient l'échantillon et la modalité, pour les autres agents contrôlés, notamment pour les ASR, E.coli, Listeria, Salmonella, Staph. Coag.

L'analyse a été pratiquée sur des échantillons prélevés le 24/09 dans la matinée, les sacs utilisés pour la mise sous vide n'étaient pas stériles. Les manipulateurs ont normalement respecté les conditions d'hygiène pour toutes les étapes depuis la récolte jusqu'à la mise sous-vide.

Au regard de ces résultats, il aurait été judicieux de pousser les analyses plus en profondeur pour identifier les différentes espèces de Clostridium présents dans les cultures et de renouveler le protocole d'analyse quelques jours plus tard pour confirmer ou infirmer ces résultats. Ce qui n'a pu être fait faute de budget supplémentaire dans le cadre de ce programme.

3.4. Analyse floristique des cultures et microcystines

Le tableau IX présente les résultats d'analyse floristique et de dosage de microcystines fournis par le laboratoire de Limnologie de M. Pitois.

Au cours du protocole 1 (Urée PMA vs Alcali AcP), au moins 3 échantillons ont été analysés à 3 dates différentes au cours des semaines les plus chaudes : 23 ou 31/07 puis 07-08 /08 et 21-22/08. C'est au cours de la période du 24/07 au 07/08 que les températures des cultures ont été les plus élevées : 23,4 le matin (+/-0,7) et 32,2 l'après-midi (+/-2).

Les proportions de droites et de spiralées ne sont pas détectables pour la totalité des échantillons sauf un, correspondant à un bassin Urée pour lequel il a été observé 16.3 % de la biomasse en droite, ce qui reste plutôt faible.

Le listing correspondant aux autres cyanobactéries est réduit à 4 genres ; les proportions de celles-ci sont pour la plupart en limite de détection, sauf pour 3 échantillons Urée 1 du 16/07 avec seulement 0.5% de la biomasse totale de Cyanobium, Urée 1 du 21/08 avec 3.8% de Leptolyngbya et Urée 2 du 07/08 avec 0.4% de Leptolyngbya, donc en proportions très faibles.

Les analyses réalisées pour la modalité Alcali+Ac.P ne montrent ni de droites, ni de spiralées, ni de cyanobactéries indésirables ; seul un échantillon du 08/08 présente une faible proportion d'autres embranchements.

Pour ce protocole, tous les dosages de microcystines présentent des valeurs inférieures à 0.15µg/g de Psec, donc conformes.

Tab. IX : COMPOSITION FLORISTIQUE - LA CANOURGUE 2018

MODALITES UREE + PMA	PROTO. 1				PROTO. 2	PROTO. 1			PROTO. 2
	R1 160718	R1 230718	R1 070818	R1 210818	R1 130918	R3 230718	R3 070818	R3 210818	R3 130918
% biomasse	Urée PMA-1	Urée PMA-1	Urée PMA-1	Urée PMA-1	Urée PMA-2	Urée PMA-1	Urée PMA-1	Urée PMA-1	Urée PMA-2
Arthrospira ondulée	99,5	99,9	99,9	96,2	99,9	99,9	99,6	83,7	99,9
Arthrospira droite	n.d.	16,3	n.d.						
Arthrospira spiralée	n.d.								
TOTAL	99,5	99,9	99,9	96,2	99,9	99,9	99,6	100	99,9
Cyanobium	0,5	0	0	0	<0,1	0	0	0	0
Leptolyngbya	0	0,1	<0,1	3,8	<0,1	0	0,4	<0,1	0,1
Planktolyngbya	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pseudanabaena	<0,1	<0,1	0	0	<0,1	0	0	0	<0,1
autres embranchements	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0,5	0,1	0,1	3,8	0,1	<0,1	0,4	<0,1	0,1
Microcystines (eq-LR, µg/g Psec)	<0,15								

MODALITES ALACALI ou NH4 +Ac P.	PROTO. 1			PROTO. 2	PROTO. 1			PROTO. 2
	R2 310718	R2 080818	R2 220818	R2 110918	R4 010818	R4 080818	R4 220818	R4 110918
% biomasse	ALC-AcP	ALC-AcP	ALC-AcP	NH4-AcP	ALC-AcP	ALC-AcP	ALC-AcP	NH4-AcP
Arthrospira ondulée	99,3	93,6	99,9	99,9	99,8	99,8	99,7	99,9
Arthrospira droite	n.d.							
Arthrospira spiralée	n.d.							
TOTAL	99,3	93,6	99,9	99,9	99,8	99,8	99,7	99,9
Cyanobium	0	0	0	0	0	0	0	0
Leptolyngbya	0,7	0,5	0	0	0,2	0,2	0,3	0,1
Planktolyngbya	<0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pseudanabaena	<0,1	0	0	<0,1	0	<0,1	<0,1	0
autres embranchements	n.d.	5,8	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0,7	6,4	0,1	0	<0,1	0,2	<0,1	0,1
Microcystines (eq-LR, µg/g Psec)	<0,15							

Pour le protocole 2, 1 seul prélèvement a été effectué le 11 ou 13/09 dans chacun des bassins Urée PMA et NHA Ac.P. Sur la période du 29/08 (début du protocole 2) au 11/09, les températures étaient en moyenne de 18,7 (+/-0,96) le matin et 25,8(+/-1,18) l'après-midi. Les 4 échantillons analysés (2 conventionnels et 2 sulfate d'ammonium et acide phosphorique) présentent 99.9 % de formes ondulées d'Arthrospira, soit une infime présence d'autres cyanobactéries. Le dosage de microcystines est conforme.

CONCLUSION

L'expérimentation 2018 conduite sous la serre aquaponique du Lycée aquacole de La Canourgue présente des résultats encourageants quant au remplacement des sources conventionnels d'azote et de phosphore par des intrants d'origine « bio ». La modalité la plus favorable est celle utilisant de l'alcali et de l'acide phosphorique avec des gains de production de 14% par comparaison avec la modalité conventionnelle (soit 5,13gPS /m²/j en situation de moyenne montagne à 600m d'altitude).

L'analyse bactériologique conduite uniquement en fin de programme au cours du protocole 2 (Urée PMA vs NH₄ Ac.P) met en évidence la présence d'une flore variée et abondante notamment dans le milieu « bio sulfate d'ammonium » dès la sortie du bassin. Reste donc à approfondir ce volet important en comparant sur les différents milieux et si possible à différents moments de la période de production tout en optimisant les conditions de récolte, le matériel utilisé et les pratiques. Néanmoins, le test de suivi de la flore bactérienne dans la spiruline fraîche, conservée sous-vide, est encourageant et mérite d'être reconduit pour affiner les résultats.

La souche de départ présente a priori d'excellentes caractéristiques du point de vue composition floristique puisque les cultures quelles que soient les modalités d'intrants ne présentent pas de proportions significatives de cyanobactéries susceptibles de générer des microcystines au-delà du seuil de 1µg/g de Poids sec. Les modes de production et les conditions environnementales n'ont pas généré l'apparition de droites (sauf pour 1 échantillon sur 17 analysés avec 16.3%). La ressource en eau utilisée (source karstique à 11°C toute l'année) pour effectuer les milieux et les compensations d'évaporation s'avère également de qualité de ce point de vue. Il sera nécessaire de vérifier néanmoins sa qualité bactériologique afin de ne pas sous-évaluer cette source potentielle de contamination en raison de présence d'activités agricoles.

ANNEXES

Les milieux ont été validés par le COPIL technique. (source : P.Foucard-ITAVI)

Annexe 1 : MILIEU DE CULTURE

Intrants	Formule chimique	Apports exprimés en unité de volume ou de poids/1000L de milieu de culture				Les milieux « intrants organiques » ne sont pas testés sur le site de La Canourgue
		Milieu Urée + MAP (conventionnel)	Milieu Urée + phosphore laminaire	Milieu Alcali	Milieu Sulfate d'ammonium	
Bicarbonate de sodium	NaHCO ₃	8 kg	8 kg	8 kg	8 kg	
Chlorure de sodium	NaCl	4 kg	4 kg	4 kg	4 kg	
Nitrate de potassium	KNO ₃	2 kg	2 kg	/	/	
Sulfate de potassium	K ₂ SO ₄	/	/	1720 g	1720 g	
Sulfate de magnésium	MgSO ₄	200 g	200 g	200 g	200 g	
Phosphate mono-ammoniaque	NH ₄ H ₂ PO ₄	200 g	/	/	/	
Acide phosphorique (laminaire)	P ₂ O ₅	/	/	180 mL	180 mL	
Urée	CH ₄ N ₂ O	20 g	70 g	/	/	
Alcali (Alcion)	NH ₄ OH	/	/	Equivalent 10 mg N-NH ₄ /L/jour = 80 mL d'alcali/jour	/	
Sulfate d'ammonium (Suez)	(NH ₄) ₂ SO ₄	/	/	/	Equivalent 10 mg N-NH ₄ /L/jour = 105 mL de sulfate de NH ₄ /jour	
Sulfate de fer (10 g/L)	FeSO ₄	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	
Sulfate de fer (20 g/L)		50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	
Oligo 7	Mix d'oligo	10ml	10ml	10ml	10ml	

Annexe 2 : MILIEU DE RECOLTE

Intrants	Formule chimique	Apports exprimés en unité de volume ou de poids / kg MS récoltée				Les milieux « intrants organiques » ne sont pas testés sur le site de La Canourgue
		Milieu Urée + MAP (conventionnel)	Milieu Urée + phosphore laminaire	Milieu Alcali	Milieu Sulfate d'ammonium	
Bicarbonate de sodium	NaHCO ₃	3 kg	3 kg	3 kg	3 kg	
Sulfate de potassium	K ₂ SO ₄	40 g	40 g	40 g	40 g	
Sulfate de magnésium	MgSO ₄	30 g	30 g	30 g	30 g	
Phosphate mono-ammoniaque	NH ₄ H ₂ PO ₄	60 g	/	/	/	
Acide phosphorique (laminaire)	P ₂ O ₅	/	55 mL	55 mL	55 mL	
Sulfate de fer (10 g/L)	FeSO ₄	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	
Sulfate de fer (20 g/L)		25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	
Oligo 7	Mix d'oligo	10ml	10ml	10ml	10ml	
Apports exprimés en unité poids ou en concentration de N-NH₄ /1						
Urée	CH ₄ N ₂ O	22 g/jour	22 g/jour	/	/	
Alcali (Alcion)	NH ₄ OH	/	/	Equivalent 10 mg N-NH ₄ /L/jour = 80 mL d'alcali/jour	/	
Sulfate d'ammonium (Suez)	(NH ₄) ₂ SO ₄	/	/	/	Equivalent 10 mg N-NH ₄ /L/jour = 105 mL de sulfate de NH ₄ /jour	

Annexe 3 : Fiche technique produit ALCALI

	FICHE TECHNIQUE	Date : 08/04/2017
	AMMONIAQUE 20,5%	CAS : 1336-21- 6

SPECIFICATIONS COMMERCIALES

Caractéristiques	Unités	Valeurs	Méthodes
TITRE	% poids	>18- 22<	Acide base
Densité à 20°C	Kg/l	>0,910 – 0,930<	Densimétrie

Analyses type

Caractéristiques	Valeurs typiques	méthodes
Extrait sec	<= 150 ppm	NFT 20 341 / NFT 90029
Aspect :	incolore	
Odeur	Irritante	

Substances :

Synonymes : ammoniac 20%

Formule : NH₄OH 20%

Poids moléculaire : 35g/mol

N°. –CAS : 1336-21-6

N°. –CE : 215-647-6

Conformément à la réglementation il n'est pas nécessaire de mentionner tous les composants.

Classification de la substance ou du mélange :

Classification CE 67/548 ou CE 1999/45

Provoque des brûlures (C ; R34)

Très toxique pour les organismes aquatiques (N ; R50)

Code(s) des classes et catégories de danger, Règlement (CE) N° 1272/2008 (CLP)

Dangers pour la santé : Corrosion cutanée – Catégorie 1B- Attention (CLP : Skin. Corr. 1B ; H314)

Toxicité spécifique pour certains organes cibles – Catégorie 3 - Attention (CLP : Stot. Se. 3 ; H335)

Dangers physiques : Très toxique pour les organismes aquatiques – Catégorie 1 – Attention (CLP : Aquatic Acute. 1 ; H400).

Substance / Préparation : Sulfate d'ammonium

No CAS : 7783-20-2

No CE : 231-984-1

Numéro annexe : 016-060-00-6

Substance(s) dangereuse(s) : Ce produit n'est pas dangereux mais contient des composants dangereux.

Annexe 4 : Fiche technique produit SULFATE D'AMMONIUM

Substance / Préparation : Sulfate d'ammonium

No CAS : 7783-20-2

No CE : 231-984-1

Numéro annexe : 016-060-00-6

Substance

Substance(s) dangereuse(s) : Ce produit n'est pas dangereux mais contient des composants dangereux.

Nom de la substance	Contenance	No CAS	No CE	Numéro annexe	REACH	Classification Xi ;R36/37/38
Sulfate d'ammonium	>99,5	7783-20-2	231-984-1	016-060-00-6		Eye Irrit. 2 Skin Irrit. 2 STOT SE 3

