

La production de spiruline « paysanne » en France : caractérisation des procédés, qualité des produits, reconnaissance et formation

Foucard P.¹, Leruste-Calpena A.², Corat A.³, Tocqueville A.¹

¹ ITAVI (Institut Technique des Filières avicole, cunicole, aquacole), F-76000 Rouen

² FSF (Fédération des Spiruliniers de France), F-34800 Clermont-l'Hérault

³ CEVA (Centre d'Etude et de Valorisation des Algues), F-22610 Pleubian

Correspondance : foucard@itavi.asso.fr

Résumé

La spiruline est une cyanobactérie consommée traditionnellement dans différents pays depuis plusieurs centaines d'années. Sa culture est possible si l'on reproduit les conditions physico chimiques propices à son développement. Dans un contexte concurrentiel fort, la filière française de production de spiruline, représentée par la FSF, est en recherche de solutions pour démarquer sa production des autres produits d'importation, notamment au travers du développement d'un cahier des charges « bio » et d'un guide de bonnes pratiques d'hygiène. Au travers du projet CASDAR « Spiruline Paysanne », la FSF et ses partenaires ont travaillé sur différents points techniques structurants pour la filière, notamment sur le screening des souches de spiruline produites en France et sur la production en conditions expérimentales de spiruline biologique. Parmi les résultats de ce projet, des résultats encourageants d'utilisation d'intrants compatibles en culture biologique de la spiruline ont permis de définir plusieurs pistes opérationnelles et d'engager celles-ci dans une démarche comparative aux modalités de la culture conventionnelle. D'autres résultats du programme « Spiruline Paysanne » ont permis de mettre en évidence l'importance de la caractérisation des souches.

Mots-clés : Cyanobactérie, filière, biologique, souches.

Abstract: The “on-farm” production of spirulina in France: characterization of processes, product quality, recognition and training

Spirulina is a cyanobacteria that has been traditionally consumed in various countries for several hundred years. Its cultivation is possible if the physicochemical conditions in which it naturally develops are ensured. In a strong competitive context, the French spirulina production sector, represented by the FSF, is looking for solutions to differentiate its production from other imported products, in particular through the development of "organic" specifications and a guide of good hygiene practices. Through the CASDAR « Spiruline Paysanne » project, the FSF and its partners worked on various structuring technical points for the sector, in particular on the screening of spirulina strains produced in France and on the production under experimental conditions of “organic” spirulina. Among the results of this project, the encouraging results of the use of compatible inputs in organic cultivation of spirulina have made it possible to define several operational avenues and to engage them in a comparative approach to the methods of conventional cultivation. Other results of the « Spiruline Paysanne » project have highlighted the importance of strain identification.

Keywords: Cyanobacteria, sector, organic, strains.

Introduction

La filière française de production de spiruline paysanne se développe depuis une cinquantaine d'année. Les producteurs sont regroupés depuis 2009 au sein d'une fédération, la FSF (Fédération des Spiruliniers de France), qui représente la profession. La FSF cherche à répondre à la demande nationale grandissante en favorisant la croissance de cette filière tout en encourageant des bonnes pratiques de production notamment à travers la rédaction d'un Guide de Bonnes Pratiques d'Hygiène (GBPH) mais aussi au travers du développement de labels permettant la valorisation de la production française afin de faire face à la concurrence étrangère. En ce sens, le développement d'un cahier des charges « bio » constitue un enjeu majeur pour la filière, face à des produits d'importation hors UE labellisés « bio » par équivalence, malgré des cahiers des charges peu restrictifs. C'est dans ce contexte de structuration et d'évolution de filière spiruline que le programme de recherche Spiruline Paysanne a été initié.

1. La filière spiruline en France : origine et enjeux

1.1 Biologie

La spiruline est une cyanobactérie multicellulaire filamenteuse d'une longueur de 50 à 500 µm et d'une largeur de 3 à 4 µm. Ce micro-organisme est très ancien puisqu'on estime son apparition à 3,5 milliards d'années. Elle se développe dans les eaux saumâtres, ainsi que dans les lacs salins des régions tropicales et semi-tropicales. Son caractère thermophile et ses besoins importants en lumière limitent son aire de répartition. En effet, cette cyanobactérie possède un métabolisme photo-autotrophe, c'est-à-dire qu'elle produit son énergie à partir d'une source de lumière par photosynthèse tout en consommant du CO₂ en guise de source de carbone. Ce processus de photosynthèse est réalisé à l'aide de plusieurs pigments qui captent la lumière tels que la phycocyanine, les chlorophylles et les caroténoïdes (Bin Abib *et al.*, 2008). La culture de spiruline nécessite de reproduire artificiellement son milieu de vie afin de créer les conditions optimales pour son développement : bassins sous serre pour la chaleur, ombrage et systèmes d'agitation. Selon la latitude et la température, les producteurs cultivent toute l'année ou seulement une partie. La production de spiruline se fait à plusieurs échelles : artisanale, semi-industrielle et industrielle. Les éléments de différenciation de ces modes de production sont la surface totale des bassins de culture et leurs surfaces unitaires, les moyens humains et matériaux utilisés, les degrés de technologie, et les objectifs.

1.2 Origine de la production paysanne française

La filière spiruline paysanne française est la digne héritière des procédés artisanaux de récolte pratiqués par les peuples autochtones du Tchad (Kanembous) et du Mexique (Aztèques). En France, la production de spiruline a débuté dans les années 70 avec le professeur Ripley Fox. Ce scientifique américain installe en 1975 un laboratoire de recherche à St Beauzile de Putois (Hérault), dans lequel il travaille pendant 30 ans au développement technique de la culture de spiruline dans un but humanitaire. En contact avec les scientifiques du monde entier, il publiera deux ouvrages sur ces travaux qui font encore référence aujourd'hui (Fox, 1986 ; Fox, 1999). Ripley Fox est par la suite rejoint par Jean-Paul Jourdan, chimiste, qui renforce l'équipe expérimentale en place. Mr Jourdan rédige un manuel technique de production artisanale qui contribuera au développement humanitaire de cette culture. Suite à ces travaux et ouvrages, les premières fermes françaises de spiruline voient le jour dans le sud de la France dans les années 90. Pratiquant une culture revendiquée « paysanne », elles suivent un modèle bien distinct des fermes industrielles présentes par exemple aux Etats-Unis.

Poussées par une volonté de construire le métier de spirulinier avec des valeurs qui leur tiennent à cœur, le sécuriser, et avoir une meilleure visibilité auprès des services institutionnels, les producteurs paysans français se rassemblent en 2009 au sein de la Fédération des Spiruliniers de France, la FSF.

Depuis sa création, la FSF n'a cessé de regrouper de plus en plus de producteurs. Composée à l'origine d'une trentaine de fermes, elle comptait 87 fermes et 84 porteurs de projets répartis sur le territoire français en 2017. Cela représente 44 000 m² de bassins avec une production de 40 tonnes annuelles (données FSF en 2017), ce qui représentait environ 10% de la demande de spiruline en France.

1.3 La filière paysanne française aujourd'hui

En 2018, la production de spiruline en France est portée par 159 structures, pour un volume de 63 tonnes d'une valeur estimée de 7 600 milliers d'euros (Recensement métiers de l'aquaculture Agreste). La spiruline sèche est commercialisée en moyenne à 120 euros le kg. La spécificité de la production française réside (1) dans le format des fermes : la moyenne de surface des bassins est de 650 m² par ferme, pour une production moyenne de 500 kg par an, et (2) dans les techniques de production utilisées. Les Spiruliniers de France privilégient les procédés « basse technologie », permettant de minimiser leur impact sur l'environnement (production de déchets réduite, utilisation d'électricité minimale, séchoirs solaires, etc.). En 2016, la consommation électrique annuelle moyenne pour une ferme de production était de 8570 kWh, ce qui représente la consommation moyenne annuelle d'un logement de 75 m² en France. Les Spiruliniers de France commercialisent leur production essentiellement en vente directe ou en circuits courts (sur Internet, en magasins de proximité...).

La majorité des fermes paysannes sont localisées dans le sud de la France (Occitanie et Provence-Alpes-Côte d'Azur), mais cette activité se développe dans toutes les régions (Auvergne-Rhône-Alpes, Bretagne, Grand Est, Haut de France, Normandie, Pays de la Loire...). Les spiruliniers estiment la consommation annuelle nationale à environ 400 tonnes de spiruline (toutes formes de produits confondues). La production nationale 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. La FSF souhaiterait augmenter la production afin de satisfaire au mieux la demande nationale. En effet, une grande partie de la spiruline consommée en France provient du marché étranger. La FSF a donc pour volonté de se démarquer *via* les engagements suivants :

- Valoriser un produit de qualité par le biais de labels et ainsi apporter une meilleure connaissance du produit aux consommateurs ;
- Accompagner les producteurs et les porteurs de projets grâce à des formations, l'élaboration d'un guide des bonnes pratiques d'hygiène (GBPH), et la recherche-développement pour poursuivre l'amélioration des pratiques de production vers une qualité sanitaire optimale de la spiruline paysanne.

Par ailleurs, en 2019, la moitié des producteurs de la FSF annonçait souhaiter passer en production labellisée ou certifiée biologique.

1.4 Les blocages : spiruline "bio" et concurrence de l'importation

Malheureusement, à l'heure actuelle les producteurs rencontrent de réelles difficultés pour obtenir le label Agriculture Biologique. En effet, la réglementation européenne sur la production biologique (848/2018) soulève plusieurs blocages au développement de cette filière :

- Les seuls fertilisants autorisés en culture biologique, pour la culture d'algues, sont les produits organiques d'origine végétale. Les intrants d'origine animale sont exclus, alors qu'ils sont autorisés pour les autres filières agricoles. Cette limitation est particulièrement dommageable pour la filière qui pourrait disposer d'un approvisionnement en intrant d'origine animale bien

plus conséquent que l'origine végétale. L'utilisation de matière organique animale permettrait par ailleurs non seulement une valorisation de déchets présents en grande quantité sur le sol français dans une démarche d'économie circulaire, mais également de créer une filière de production d'intrants biologiques en circuit court et en quantité suffisante pour l'ensemble des spiruliniers en demande, ce qui n'est pas le cas avec la matière organique végétale à l'heure actuelle.

- Les fertilisants organiques actuellement autorisés ne permettent pas de garantir la durabilité et la compétitivité du procédé de production, car ils ne sont pas adaptés aux spécificités de la spiruline par rapport aux cultures traditionnelles. Pour rappel, la spiruline est un organisme photo-autotrophe qui produit sa matière organique par photosynthèse. Elle a besoin de nutriments sous forme minérale, et n'est elle-même pas capable de minéraliser la matière organique pour en tirer les nutriments nécessaires à son métabolisme. Les intrants organiques contiennent donc des nutriments, mais qui ne sont pas directement biodisponibles pour la spiruline. De ce fait, les règles actuelles de production biologique conduisent à une dégradation plus rapide des milieux de culture par rapport au mode de culture conventionnel. Cette dégradation engendre une augmentation de la consommation en eau et de la quantité d'effluents rejetés. Les experts européens d'EGTOP (*Expert Group for Technical Advice on Organic Production*), qui partagent ce constat, ont proposé fin 2019 que la réglementation évolue pour tenir compte de ces spécificités.
- Enfin, la réglementation européenne favorise la présence sur le marché intérieur de produits importés de pays hors Union Européenne à bas coûts de production et qui bénéficient du label bio grâce un régime d'équivalence peu contraignant. Les producteurs européens, qui rencontrent des difficultés dans l'application du Règlement bio 848/2018, ne sont pas en mesure de faire face à cette concurrence, malgré leurs actions nombreuses et de plus en plus structurées pour optimiser les intrants, gérer les effluents et produire une biomasse de haute qualité. A titre d'exemple, les producteurs français ont initié des démarches pour parvenir à la conversion biologique de la culture de spiruline depuis 2009, et n'ont toujours pas trouvé un approvisionnement en intrant azoté compatible en culture biologique qui satisfasse toutes les caractéristiques indispensables à son utilisation. En parallèle, ces producteurs ont vu leur part de marché diminuer de 20% entre 2017 et 2019 au profit de produits importés.

1.5 Vers une culture biologique de la spiruline "made in France"

La culture biologique de la spiruline est un des objectifs de fond de la FSF depuis sa création. Elle répond à une demande grandissante des consommateurs pour ce label et doit d'ailleurs sa création à cette problématique à l'origine. Les membres de la FSF travaillent donc sur cette problématique depuis 2009, et une proposition de cahier des charges bio a été soumis en mai 2015 à l'INAO (Institut National de l'Origine et de la Qualité) pour validation. Suite à sa validation, il a été transmis au Ministère de l'Agriculture, qui ne l'a finalement pas accepté fin 2016. En parallèle, la spiruline a été intégrée le 7 mai 2017 à l'échelle européenne dans le cahier des charges "Algues marines" (règlement CE n°673/2016), bien qu'elle ne soit ni une algue, ni marine.

Hormis pour les sources d'azote et de phosphore, tous les autres intrants nécessaires à l'alimentation de la spiruline en culture biologique sont des produits utilisables en agriculture biologique (sulfate de potasse, sulfate de magnésium, bicarbonate de sodium et/ou dioxyde de carbone, complexes de microéléments, ...). Il reste donc à remplacer les sources d'azote (nitrate de potasse et urée) et de phosphore (phosphate mono-ammonique) conventionnelles ; ce qui est à ce jour un véritable défi pour la filière. Le cahier des charges « Algues marines », tel que nous l'avons évoqué ci-dessus, ne prend pas en compte les caractéristiques biologiques et physiologiques de la spiruline, et complexifie la conversion biologique de cette culture.

La FSF s'est engagée à porter au niveau communautaire tous les points bloquants pour la production de spiruline « biologique ». En janvier 2017, elle a déposé deux demandes de modification à ce règlement pour demander l'autorisation d'utiliser des intrants d'origine animale, et des intrants azotés produits par *stripping*, un procédé permettant d'extraire les molécules azotées de matière organique par distillation. En décembre 2019, le sous-groupe "aquaculture" du comité EGTOP a donné un avis favorable à ces demandes.

Pour continuer à appuyer ces problématiques, la FSF a participé en février 2020 à une Délégation portée par les régions Pays de la Loire, Nouvelle Aquitaine, Occitanie, Normandie, qui a permis de rencontrer à Bruxelles une représentante du comité d'étude pour la production biologique (composé notamment de membres de la DG-Agri en charge de la politique de l'UE dans les domaines de l'agriculture et du développement rural, et de la DG-Mare en charge de la politique de l'UE concernant les affaires maritimes et la pêche). Malgré l'avis positif émis par le sous-groupe aquaculture du comité EGTOP, cette commission décisionnaire a émis des doutes concernant l'utilisation de sulfate d'ammonium d'origine animale et le *stripping*. La DG-Agri et la DG-Mare s'interrogent (1) sur l'impact de l'utilisation de l'origine animale pour la production d'intrants sur la qualité sanitaire de la spiruline, (2) sur la classification du *stripping* en termes de procédé. Pour conforter ces demandes, la FSF a envoyé suite à la délégation de février un rapport de synthèse de l'utilisation de cet intrant, accepté en mention Ecocert et utilisé depuis quelques années par plusieurs producteurs paysans sans qu'il n'ait été observé de dégradation significative de la qualité de leur spiruline. Pour le moment, le comité d'étude pour la production biologique (*Expert Group on Organic Production*) n'a pas donné son avis final sur ces demandes, qui restent en attente.

1.6 La R&D au service de la construction de la filière spiruline paysanne

Des travaux de recherche ont été engagés sur la période 2016-2019 dans le cadre du programme de recherche « Spiruline Paysanne » financé par le CASDAR et dirigé par l'ITAVI en partenariat avec la FSF, le CEVA (Centre d'Etude et de Valorisation des Algues), l'ASTREDHOR (Institut Technique de l'Horticulture), et différents organismes de l'enseignement agricole (CFPPA de Hyères, EPLEFPA de la Lozère, LEGTPA de Bréhoulou, Agrocampus Ouest). Le but de ce projet était d'améliorer les connaissances des systèmes de production de spiruline, de la souche au produit fini, afin de permettre la mise en place d'une démarche qualité et de consolider l'accompagnement technique et la formation des adhérents.

2. Mise au point et étude des performances d'une banque de souches de spiruline

La FSF a collecté, depuis sa création et en amont via ses membres, différents prélèvements de spiruline à travers le monde. Jusqu'à présent, les souches étaient conservées par les producteurs qui les cultivaient et, en cas d'aléas de culture, la pratique consistait à récupérer un inoculum chez le producteur voisin afin de relancer le site de production. Un des objectifs du projet Spiruline paysanne a donc été de créer une collection de souche de spiruline FSF afin de sécuriser la conservation et l'approvisionnement des différentes souches cultivées au sein de la fédération.

2.1 Création et entretien d'une collection de souches de spiruline FSF

15 prélèvements ont été réalisés auprès de producteurs adhérents de la Fédération des Spiruliniers de France. Pour cela, un protocole de prélèvement et d'expédition a été transmis à chacun ainsi que le flaconnage nécessaire à une bonne préservation de la culture prélevée. Une fiche de traçabilité et d'expédition a été jointe à chaque envoi. La méthodologie appliquée est présentée en Figure 1.

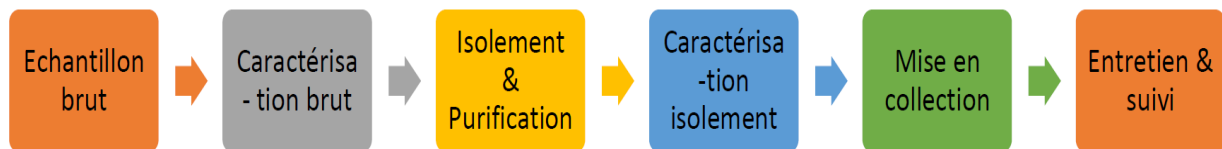


Figure 1 : Processus de caractérisation et de mise en collection des souches FSF

Pour chaque prélèvement, les différentes morphologies observées ont été isolées. L'isolement des différents morphotypes a été réalisé à la micropipette sous microscope afin de ne prélever qu'un seul filament. Le filament isolé a ensuite été "lavé" dans plusieurs gouttes de milieu de culture stérile avant d'être remis en culture dans 2 mL de milieu « *Spirulina medium modified* » (SMM) (Andersen, 2005). Chaque isolement a été réalisé en triplicat. Les isollements ont été placés en enceinte thermostatée à 25°C sous faible intensité lumineuse constante ($\sim 30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Après vérification au microscope de la pureté des cultures (présence d'un seul morphotype), un nouvel isolement a été réalisé afin de s'assurer de l'absence de morphologies multiples dans l'échantillon. À l'issue de cette étape, les souches isolées ont été mises en collection en enceinte thermostatée à 20°C sous faible intensité lumineuse constante. Un repiquage des souches est réalisé tous les 2 à 3 mois depuis la mise en collection de ces souches.

Chaque prélèvement a été caractérisé dès réception par le CEVA puis après isolement. On entend par caractérisation à ce stade, une description morphologique des trichomes de spiruline. Des observations microscopiques et des analyses d'image ont permis de mesurer la longueur, le diamètre et le nombre de spires des filaments afin de disposer de l'espacement des spires. Des photographies ont été réalisées pour chacune des morphologies observées.

Sur les 15 prélèvements échantillonnés chez les producteurs adhérents de la FSF, 25 souches ont été isolées sur la base de critères morphologiques (ondulées, spiralées, droites) et mises en collection. Sur les 25 souches isolées, 20 d'entre elles ont présenté des croissances suffisantes pour être maintenues en collection. Sur la durée du projet, d'autres souches ont ensuite été intégrées progressivement à la collection pour atteindre à ce jour 32 souches au total. Un codage des souches a été mis en place.

2.2 Essais de conservation de souches de spiruline sur milieu gélosé

En parallèle d'une conservation de la collection de souches en milieu liquide, des essais de conservation sur milieu gélosé ont été réalisés. Six souches dont trois de morphologie ondulée (P34RB, C34GP et XP83RR), deux de morphologie spiralée (L85FR et LA85FR) et une de morphologie droite (MD83RR) ont été sélectionnées sur la base de leur spécificité de maintien en collection (robustesse, fragilité, amas...). Pour cela, le milieu SMM a été supplémenté en agar-agar à une concentration de 1,3%. Deux types d'ensemencement ont été testés : en tapis et en strie en duplicat. Une observation macroscopique et microscopique des cultures gélosées a été réalisée à J30.

Ces travaux bien que très préliminaires, ont permis de mettre en évidence différents comportements, que ce soit en fonction des souches, ou en fonction des modes d'ensemencement. En effet, si la souche C34GP n'est pas parvenue à se développer en milieu gélosé, les 5 autres ont toutes montré un développement à J30, pour l'une ou l'autre des techniques d'ensemencement ou les deux (Figure 2).

Si pour l'essentiel des souches testées, la morphologie a été préservée (P34RB, L85FR, LA85FR, MD83RR), une modification de la conformation des filaments a été observée pour la XP83RR avec un "enroulement" des filaments sur eux-mêmes (Figure 3). Cette modification pourrait être liée à une trop forte densité de spiruline et à un encombrement trop important limitant ainsi l'espace disponible pour l'accroissement des filaments dans les conditions de culture en milieu solide. La souche L85FR a présenté quant à elle un comportement spécifique avec la formation de patch/colonie quelle que soit la méthode d'ensemencement (Figure 4). Enfin, la souche LA85FR a montré une croissance et une

préservation de sa morphologie pour la condition ensemencée en tapis tandis qu'aucune croissance n'a été observée pour l'ensemencement en stries.

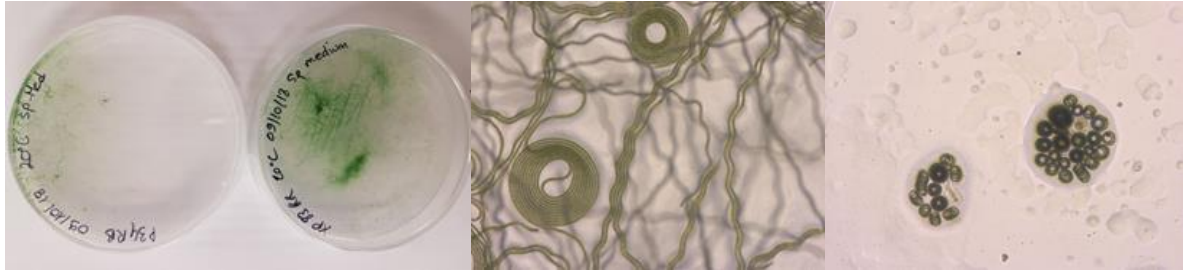


Figure 2 (à gauche) : Photographie des boîtes de Pétri à J30.

Figure 3 (au milieu) : Photographie au microscope de la souche XP83RR (gauche) à J30 sur milieu gélosé

Figure 4 (à droite) : Photographie au microscope de la souche L85FR (droite) à J30 sur milieu gélosé

2.3 Evaluation des performances de souches de spiruline

L'objectif de ce travail est d'évaluer les performances de croissance des souches en fonction de la température et de l'intensité lumineuse. Parmi les souches en collection, 5 ont été sélectionnées. Il s'agit de deux souches de morphologie ondulée (P34RB et P81AC), deux souches de morphologie spiralée (E13VR et T66CL) et une morphologie droite (MD83RR). La sélection de ces 5 souches s'est basée sur les souches les plus cultivées par les producteurs membres de la FSF.

Ainsi, pour chacune de ces souches, différentes conditions de température (15-30-40°C) et d'intensité lumineuse (20-100-200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) ont été testées. Les cultures ont été menées sur le milieu SMM en enceinte thermostatée, en erlenmeyer de 250 mL équipé d'un système de bullage. Les cultures ont été ensemencées à une absorbance de 0,3 à 880 nm. Un suivi journalier de l'absorbance des cultures à 880 nm a été réalisé ainsi qu'une matière sèche à l'issue des expérimentations. Un suivi photographique des systèmes de culture a également été réalisé quotidiennement.

Le choix de la gamme température à tester s'est appuyé sur les valeurs extrêmes auxquelles peuvent être exposés les bassins de culture des producteurs. En effet, en début ou fin de saison ou la nuit, la température du bassin peut descendre fortement pour atteindre des valeurs proches de 15°C. A l'inverse, en plein été, la température sous serre peut être très importante et entraîner une "surchauffe" des cultures (40°C). La température de 30°C constitue la température "optimale" de la spiruline, bien que cette valeur soit propre à chaque souche.

La Figure 5 présente les taux de croissance moyens obtenus pour chacune des souches aux différentes températures et intensités lumineuses appliquées. Les résultats mettent en évidence une tendance à mieux résister aux faibles températures pour les morphologies ondulées et droites, que les morphotypes spiralés. La spiruline droite montre une bonne résistance aux valeurs extrêmes. En effet, elle présente le meilleur taux de croissance à 15°C et faible intensité lumineuse (20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), à 30°C à forte intensité lumineuse (200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) ainsi qu'à 40°C à faible et moyenne intensité lumineuse (20 et 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). L'impact de l'intensité lumineuse semble faible dans les conditions d'expérimentation, celle-ci étant probablement non limitante. Enfin, la température optimale est proche de 30°C pour l'ensemble des souches testées.

Initialement considérée comme un frein à la productivité des bassins, il semblerait finalement que la morphologie droite présente des taux de croissance similaires voire supérieurs aux morphologies ondulées. Sa résistance aux conditions extrêmes peut être un des facteurs de dominance de ces morphologies dans les bassins de production. Des suivis en ferme de production seraient nécessaires pour appuyer ces résultats.

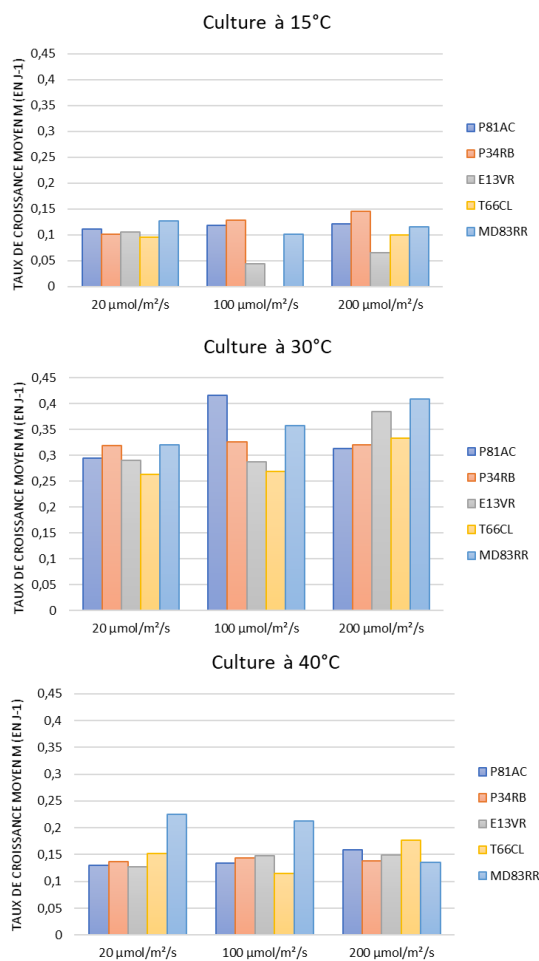


Figure 5 : Taux de croissance moyens obtenus pour chacune des souches à 15, 30 et 40°C à différentes intensités lumineuses

Les travaux réalisés ont permis la mise en collection et la sécurisation d'une trentaine de souches ou plutôt de morphotypes. Il est essentiel maintenant de continuer l'entretien, le développement et la sécurisation de la collection en optimisant notamment les méthodes de conservation (milieu gélosé, cryopréservation...). La question à laquelle il est désormais essentiel de répondre concerne la diversité génétique des souches en collection. S'agit-il d'une même espèce sous plusieurs morphotypes, ou de différentes espèces ? L'approfondissement de cette question fait partie des objectifs du projet « SPIRKAL » initié en 2019 (financé par le FEAMP) dans la continuité du projet Spiruline Paysanne. Ce deuxième volet d'expérimentations a également vocation à évaluer les performances des souches sur différents intrants dans différentes conditions de température et d'éclairage.

3. Mise au point de pratiques innovantes pour la production de spiruline biologique

La finalité de cette action était d'aboutir à une ou plusieurs solutions techniques permettant de produire de la spiruline en respectant le cahier des charges AB.

3.1 Recul technique, et choix des intrants

La spiruline a besoin de sources d'azote minéral (généralement prodiguées sous forme de nitrates ou d'urée), en plus du carbone inorganique (CO₂) et d'autres minéraux comme le phosphore, le calcium, le magnésium, le fer... Quelques études se sont penchées sur l'utilisation d'azote ammoniacal en production de spiruline tel que le sulfate d'ammonium et le chlorure d'ammonium : les résultats de ces études montrent que les formes ammoniacales sont consommées préférentiellement aux formes

nitriques, mais que l'azote ammoniacal peut également s'avérer toxique à trop haute concentration (Belkin *et al.*, 1991 ; Yuan *et al.*, 2011 ; Bao, 2012), et ce en relation directe avec le pH alcalin de l'eau. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que la spiruline pourrait avoir un métabolisme mixotrophe (capacités autotrophes et hétérotrophes) (Marquez *et al.*, 1993 ; Andrade *et al.*, 2007) vis-à-vis de l'élément carbone, et que la productivité en conditions mixotrophes pouvait être meilleure qu'en conditions simplement autotrophes (Barrocal *et al.*, 2010). Cependant, très peu de publications évoquent l'efficacité d'intrants azotés organiques pour la culture de spiruline (Ak, 2011). Globalement, la littérature est peu fournie sur l'utilisation d'azote exclusivement ammoniacal ou organique en production de spiruline. C'est pourquoi il s'est avéré nécessaire d'effectuer des expérimentations pour collecter des données sur la faisabilité de la culture biologique de la spiruline.

Plusieurs engrais ont été testés dans le cadre du projet « Spiruline Paysanne » pour aboutir à des alternatives « biologiques » aux intrants conventionnels. Il a été choisi de faire un focus sur deux d'entre eux :

- L'azote ammoniacal sous forme de sulfate d'ammonium : cet engrais azoté liquide principalement constitué d'ammoniac a été produit à l'aide d'un procédé de *stripping* de l'ammoniaque volatile issu de digestats de méthanisation. Le produit commercial est composé d'environ 140 mg/L d'azote ammoniacal.
- L'azote organique sous forme de solutions commerciales clés en main : différentes solutions commerciales d'intrants organiques azotés sont disponibles sur le marché, formulés à partir de matières premières animales et/ou végétales. Dans le cadre de l'essai, un intrant commercial titré à 30 g/L d'azote total, constitué de 100% de matière première végétale a été testé.

3.2 Matériel et méthodes

La station horticole ASTREDHOR-RATHO, partenaire du projet Spiruline Paysanne, a été le siège des expérimentations menées par l'ITAVI en partenariat avec la FSF sur la thématique « intrants bio ». Un espace de production situé sous une serre en verre à simple paroi, avec possibilité de gestion automatisée des paramètres climatiques (automatisation de l'ombrage et de l'ouverture des ouvrants) a été mise à disposition pour ces essais.

Ces cultures expérimentales ont été conduites de manière à reproduire les conditions de culture que l'on trouve en production commerciale : conditions sous serre, culture en bassins avec brassage du milieu de culture, luminosité importante et contrôlée par un ombrage partiel, températures estivales, pH alcalin, formulation des milieux de culture selon le modèle « Jourdan » adapté par la FSF, apports d'intrants compensatoires au fur et à mesure des récoltes. La variable principale entre les modalités testées était la source d'azote. Les pertes d'eau par évaporation dans les bassins étaient compensées par des apports d'eau hebdomadaires. Des bassins de culture ont été conçus en structure bois et recouverts de bâches en EPDM : au total, 12 bassins, 5,5 m² de surface chacun, occupaient 60 m² de surface au sol. Chaque bassin avait une capacité d'accueil de 1000 L de milieu de culture, avec une hauteur de remplissage avoisinant les 18 cm. La phase de récolte et de transformation de la spiruline se divisait en plusieurs étapes clés : (1) arrêt de brassage des bassins pour favoriser la flottaison et la concentration de la spiruline en couche mince, (2) récupération de la couche en surface (sur 75% de la surface des bassins), (3) filtration de la biomasse liquide sur tamis avec une toile alimentaire en polyamide de maille 20 µm, (4) disposition de la biomasse filtrée dans des toiles en tissu taffetas nylon alimentaire, (5) presse de la spiruline avec une presse à fruits, (6) mise en forme de la spiruline sous forme de « spaghettis » à l'aide d'un pistolet à mastic équipé d'un opercule troué et (7) séchage de la spiruline à l'aide d'un déshydrateur à 45°C pendant 12h.

Chaque test mené sur ce dispositif expérimental durait en moyenne trois mois. Les modalités testées étaient répliquées trois fois et une randomisation était effectuée sur la position des bassins tests. Entre

chaque expérimentation, les bassins étaient vidangés et désinfectés. Les principales données acquises pendant les essais étaient les paramètres d'ambiance de la serre (T° de l'air, luminosité PAR) et les paramètres physico-chimiques du milieu de culture (T°, pH, taux d'oxygène, conductivité, formes de l'azote et minéraux dissous). Les récoltes ont été effectuées à intervalles réguliers afin de déterminer le rendement en production, tandis que des échantillons de spiruline sèche ont été envoyés en laboratoire pour l'analyse de leur qualité nutritionnelle et sanitaire.

Le Tableau 1 ci-dessous récapitule les modalités testées. Les intrants ont été testés de manière à étudier l'impact de doses et de modes d'apport. Le milieu de culture de base était formulé sur la base d'un protocole interne FSF lui-même adapté du milieu « Jourdan » (décrit dans Fox, 1999). Une spécificité commune à l'ensemble des modalités « bio » était (1) le remplacement de sources de phosphore conventionnel (phosphate monoammonique) par un intrant phosphaté agréé « bio » issus de laminaires (algue brunes), et (2) le remplacement des sources d'azote conventionnel (urée et nitrate de potasse) par des intrants bio à base d'azote ammoniacal ou d'azote organique.

Tableau 1 : Bilan des modalités testées pour les intrants azotés bio

Code modalité	Source d'azote	Fréquence d'apport	Dose d'apport	Mode d'apport
CONV-AAPR	Urée et nitrates "Conventionnel"	Milieu de base et apports post récolte	300 mg N/L dans MC puis 140 g N / kg de spiruline produite	Batch (apport en une fois)
CONV-ANDJ_10		Apport journalier	10 mg N / L / jour	
ORGA-AAPR	Azote organique "Bio"	Milieu de base et apports post récolte	300 mg N/L dans MC puis 140 g N / kg de spiruline produite	
ORGA-ANDJ_10		Apport journalier	10 mg N / L / jour	
SULFAMMO-AAPR	Azote ammoniacal "Bio"	Milieu de base et apports post récolte	300 mg N/L dans MC puis 140 g N / kg de spiruline produite	
SULFAMMO-ANDJ_10		Apport journalier	10 mg N / L / jour	
SULFAMMO-ANDJ_20		Apport journalier	20 mg N / L / jour	
SULFAMMO-ANDJ_10/GAG		Apport journalier	10 mg N / L / jour	

La démarche employée pour définir ces modalités doses/modes d'apport de l'azote a été assez empirique en l'absence de littérature explicite sur ces sujets et sur ces intrants. Il est à noter que les cultures conventionnelles ont pour particularité d'avoir un stock d'azote sous forme de nitrates en plus des apports d'urée ; tandis que les cultures bio ne peuvent pas recourir à ce type d'apport et débutent donc sans ce stock d'azote nitrique initial.

3.3 Résultats et discussion

3.3.1 Rendement en spiruline sèche

Les principaux résultats à retenir des différents essais menés sont les suivants (résumés dans le Tableau 2) :

- La culture conventionnelle (à base d'urée) peut être menée aussi bien en « CONV-AAPR » qu'en « CONV-ANDJ_10 », cela n'impacte pas le rendement, dans les deux cas le stock de nitrates (apporté par le nitrate de potasse) constitue une réserve d'azote largement suffisante.
- Les apports d'azote organique et d'azote ammoniacal ne fonctionnent pas en « AAPR », ces stratégies (SULFAMMO-AAPR et ORGA-AAPR) aboutissent à une mortalité rapide de la spiruline et à des rendements nuls, il est donc nécessaire de recourir à une stratégie d'apport journalier « ANDJ ».

- Pour l'azote ammoniacal, il est préférable d'apporter une dose de 10 mgN/L/jour (SULFAMMO-ANDJ_10), ce qui permet d'aboutir à des rendements à la hauteur du conventionnel (CONV-AAPR). D'autres tests montrent qu'il est possible de monter jusqu'à 15 mgN/L/jour sans impact notable sur le rendement cependant. Notons que le mode d'apport (SULFAMMO-ANDJ_10 et SULFAMMO-ANDJ_10/GAG) n'a aucun impact sur le rendement, il ne semble donc pas forcément utile d'apporter l'azote ammoniacal en goutte à goutte de manière étalée sur la journée. A partir d'une dose d'apport de 20 mgN/L/jour (SULFAMMO-ANDJ_20), une baisse de rendement est constatée, et ce en raison de la toxicité de l'azote ammoniacal pour la spiruline, à trop forte dose en pH alcalin.
- Pour l'azote organique, une dose d'apport de 10 mgN/L/jour fonctionne, mais aboutit à un rendement moins intéressant qu'en conventionnel (-30%). Un autre test ultérieur a cependant abouti à un rendement identique. Des tests sur une durée plus longue et/ou sur d'autres intrants organiques doivent être menés pour collecter davantage de données.

Tableau 2 : Bilan des principaux résultats obtenus sur les intrants azotés bio en termes de rendement

	CONV-ANDJ_10	ORGA-AAPR	ORGA-ANDJ_10	SULFAMMO-AAPR	SULFAMMO-ANDJ_10	SULFAMMO-ANDJ_20	SULFAMMO-ANDJ_10/GAG
Différence de rendement avec CONV-AAPR	=	-100%	-30%	-100%	=	-40%	=

Concernant l'azote ammoniacal, il s'est 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 longs travaux de recherche en laboratoire.

Concernant l'azote organique, le même type de mode d'apport permet d'éviter une hausse trop rapide de turbidité du milieu 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 mg N_{organique} L/jour. Ce mode de culture « organique » n'a été qu'approché durant les tests expérimentaux menés dans le cadre du programme, il doit encore être étudié pour évaluer son plein potentiel. Il est toutefois d'ores et déjà intéressant de noter qu'il a été contre toute attente possible de faire pousser de la spiruline avec de l'azote organique, mettant en évidence une capacité de la spiruline à utiliser ce type d'intrants, ou tout du moins à utiliser les rejets métaboliques d'une théorique flore hétérotrophe accompagnatrice dont l'impact sur les normes sanitaires restent à être étudiées plus en détail.

3.3.2 Qualité nutritionnelle sur spiruline sèche

L'impact des intrants à base d'azote ammoniacal ou d'azote organique sur la qualité du produit final est très limité (Tableau 3). Notons toutefois que les résultats de l'année 2019 sur la modalité SULFAMMO-ANDJ_10, et ceux de l'année 2018 sur la modalité ORGA-ANDJ_10 montrent des teneurs en phycocyanines plus faibles, la composition nutritionnelle globale des spirulines ne semble pas impactée et reste dans les normes attendues au vu de la littérature disponible sur le sujet.

Tableau 3 : Bilan des principaux résultats obtenus sur les intrants azotés bio en termes de qualité nutritionnelle

Paramètre recherché	Unités	CONV-AAPR		SULFAMMO-ANDJ_10		ORGA-ANDJ_10		Critères (valeurs littérature)	Source
		Résultats 2018	Résultats 2019	Résultats 2018	Résultats 2019	Résultats 2018	Résultats 2019		
C-Phycocyanine	mg/100g	13352 (±667)	12947 (±647)	12679 (±633)	10178 (±508,9)	11416 (±571)	13020 (±651)	5000-15000	Boussiba et Richmond 1979; Sarada, Pillai, et Ravishankar 1999 ; Niu et al. 2007; ANSES 2014; Holman et Malau-Aduli 2013; USP 2015
Phycocyanines brutes	mg/100g	24434 (±1221)	24447 (±1222)	23197 (±1159)	19229 (±961)	20886 (±1044)	24484 (±1224)	15000-25000	
Protéines	g/100g	63,4 (±1,9)	63,9 (±1,9)	63 (±1,9)	58,5 (±1,7)	64,7 (±1,9)	67,8 (±2,0)	45-70	Falquet et Hurni, 2006, Gershwin et Belay 2008, Holman et Malau-Aduli 2013, ANSES 2014; USP 2015
Fer	mg/100g	52 (±5,2)	61 (±6,1)	43,2 (±4,2)	46,3 (±4,63)	54,5 (±5,4)	55,9 (±5,6)	30-170	Fox 1999; ANSES 2014
Béta carotène	mg/100g	125 (±31,2)	/	141 (±35,2)	/	121 (±30,2)	/	140-170	Gershwin et Belay 2008; Holman et Malau-Aduli 2013; ANSES 2014

3.3.3 Qualité microbiologique et contaminants sur spiruline sèche

Des analyses microbiologiques ont été réalisées pour mesurer l'impact des intrants à base d'azote ammoniacal ou d'azote organique (Tableau 4). Les valeurs critères auxquelles les mesures ont été comparées sont issues du GBPH développé par la FSF. Globalement, toutes les valeurs mesurées étaient satisfaisantes à acceptables : les intrants testés dans le cadre des essais n'ont pas abouti à des dépassements de normes.

Tableau 4 : Bilan des principaux résultats obtenus sur les intrants azotés bio en termes de qualité microbiologique

Paramètre recherché	Type de critère	Intervalle de valeurs du critère (<m = satisfaisant; >M = non satisfaisant; ; >m et <M = acceptable)		CONV-AAPR		SULFAMMO-ANDJ_10		ORGA-ANDJ_10	
		m	M	Résultats 2018	Résultats 2019	Résultats 2018	Résultats 2019	Résultats 2018	Résultats 2019
Micro organismes aérobies 30°C	Hygiène	100 000 UFC/g	1 000 000 UFC/g	38000	150000	3000	68000	5000	220000
Coliformes thermotolérants 44°C	Hygiène	100 UFC/g	1 000 UFC/g	<10	<10	200	<10	<10	<10
Anaérobie sulfite réducteurs 46°C	Hygiène	100 UFC/g	1 000 UFC/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Clostridium perfringens	Hygiène	10 UFC/g	100 UFC/g	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Staphylocoques à coagulase positive	Hygiène	100 UFC/g	1 000 UFC/g	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Salmonella	Sécurité	Absence /25g		Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
Listeria monocytogènes	Sécurité	100 UFC/g		<10	<10	<10	<10	<10	<10

Globalement, toutes les valeurs mesurées étaient satisfaisantes à acceptables, et les intrants testés dans le cadre des essais n'ont pas abouti à des dépassements de normes. Par ailleurs, des analyses de taux de cyanotoxines (microcystines) ont été réalisées avec un laboratoire prestataire : les modalités « CONV-AAPR », « SULFAMMO-ANDJ_10 » et « ORGA-ANDJ_10 » contenaient toutes les trois des taux de microcystines inférieurs à 0,3 µg/g, respectant donc les normes pour ce type de produit, le seuil préconisé par le GBPH (basé sur les recommandations de l'ANSES, 2017) étant de 1 µg/g.

Conclusion

Les tests menés sur la nutrition alternative de la spiruline ont permis d'aboutir à des résultats intéressants tant du point de vue technique que scientifique. Les données de qualité nutritionnelle et microbiologique sont satisfaisantes pour toutes les modalités testées. En termes de rendement, l'azote ammoniacal est toutefois plus performant que l'azote organique pour des raisons *a priori* liées au métabolisme de la spiruline. L'approche visant à effectuer des apports journaliers selon un objectif de dose maximale de 10 mg $N_{\text{ammoniacal}}$ /L/jour s'étant avérée adéquate pour avoir un rendement similaire à ce que l'on peut obtenir en culture conventionnelle. Elle peut donc servir de base de fonctionnement pour les producteurs afin de limiter les risques de mortalité liés à l'usage de cet intrant. L'usage des intrants organiques reste cependant une piste de développement poursuivie par la FSF, et d'autres expérimentations devront être menées avec d'autres intrants clés en main à base de matières premières végétales.

Ces travaux ont également permis d'identifier les contaminants présents dans les sites de production, et d'aller vers une meilleure qualité des produits mis sur le marché. Les différentes souches cultivées par les adhérents de la FSF ont été mises en collection au CEVA afin de sécuriser la production.

Les résultats générés par le programme, l'évolution des besoins de la filière, et l'inertie de réponse de l'Europe concernant les demandes de la FSF sur les nécessaires évolutions réglementaires liées à l'usage des intrants issus de stripping ont conduit les partenaires à déposer le projet FEAMP SPIRKAL, initié en 2020, afin d'approfondir ces travaux.

Références bibliographiques

- Ak I., 2011. Effect of an organic fertilizer on growth of blue-green alga *Spirulina platensis*. *Aquaculture International* 20, 413-422.
- Andersen R.A., 2005. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, New York, 578 p.
- Andrade M.R., Costa J.A.V., 2006. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture* 264, 130-134.
- ANSES, 2017. Saisine n° 2014-SA-0096. AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux « risques liés à la consommation de compléments alimentaires contenant de la spiruline » Maisons-Alfort. Disponible en ligne, consulté le 09/10/2020 <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT2014SA0096.pdf>
- Bao Y., Shumeu W., Wei C., Xia W., 2012. An Optical-Density-Based Feedback Feeding Method for Ammonium Concentration Control in *Spirulina platensis* Cultivation. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 22(7), 967-974.
- Belkin S., Boussiba S., 1991. Resistance of *Spirulina platensis* to ammonia at high pH values. *Plant Cell Physiol.* 32(7), 953-958.
- Bin Abib A., Parvin M., Huntington T.T., Hasan M.R., 2008. A Review on Culture, Production and Use of *Spirulina* as Food for Humans and Feed for Domestic Animals and Fish. FAO Report number: FIMA/C1034, disponible en ligne, consulté le 09/10/2020 <http://antenna-france.org/wp-content/uploads/2015/03/FAO-report-spirulina-2008.pdf>
- Boussiba S., Richmond A.E., 1979. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology* 120 (2), 155-159.

Falquet J., Hurni J.P., 2006. Spiruline - Aspects nutritionnels. Antenna Technologies.

Fox R.D., 1986. Algoculture : la spirulina, un espoir pour le monde de la faim, EdiSud, Algae as food, 319p.

Fox R.D., 1999. Spiruline, Technique pratique et promesse. Edisud Aix-En-Provence, 246p.

Gershwin M.E., Belay A., 2008. Spirulina in human nutrition and health. CRC Press: 328p.

Holman B.W.B., Malau-Aduli A.E.O., 2013. "Spirulina as a livestock supplement and animal feed. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 97 (4), 615-623.

Marquez F.J., Sasaki K., Kakizono T., Nishio N., Nagai S., 1993. Growth Characteristics of Spirulina platensis & in Mixotrophic and Heterotrophic Conditions. Journal of fermentation and bioengineering 76(5), 408-410.

Sarada R., Pillai M.G., Ravishankar G.A., 1999. Phycocyanin from Spirulina sp: Influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. Process Biochemistry 34 (8), 795-801.

USP, 2015. United States pharmacopeia dietary supplements compendium.

Vardaka E., Kormas K.A., Katsiapi M., Genitsaris S., Moustaka-Gouni M., 2016. Molecular diversity of bacteria in commercially available Spirulina food supplements. PeerJ. 2016; 4, e1610

Yuan X., Kumar A., Sahu A.K., Ergas S.J., 2011. Impact of ammonia concentration on Spirulina platensis growth in an airlift photobioreactor. Bioresource Technology 102(3), 3234-3239.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL ou DOI).